



Rita Francisco Marques

Licenciatura em Bioquímica

**Monóxido de carbono como agente protector
num modelo de hipóxia-isquémia e reperfusão
através da activação da autofagia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Helena Luísa de Araújo Vieira, Investigadora,
CEDOC FCM-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Prof. Doutora Margarida Castro Caldas

Vogal: Doutora Helena Luísa de Araújo Vieira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2012



Rita Francisco Marques

Licenciatura em Bioquímica

**Monóxido de carbono como agente protector
num modelo de hipóxia-isquémia e reperfusão
através da activação da autofagia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Helena Luísa de Araujo Vieira, Investigadora,
CEDOC FCM-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Prof. Doutora Margarida Castro Caldas

Vogal: Doutora Helena Luísa de Araújo Vieira



Outubro 2012

“Copyright”

Monóxido de carbono como agente protector num modelo de hipóxia-isquémia e reperfusão através da activação da autofagia

Rita Francisco Marques

Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

O céu não é o limite, apenas o início!

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Doutora Helena Vieira bem como à Doutora Patrícia Boya pela oportunidade e a confiança que depositaram em mim para a realização desta dissertação de mestrado, que contribuiu para o meu crescimento científico e pessoal.

Quero agradecer todo o apoio, estimulação, ajuda e disponibilidade, aos dois grupos de trabalho fantásticos onde estive inserida neste último ano, em especial à Cláudia Queiroga e Esther Seco pela paciência e compreensão que tiveram comigo ao longo deste ano. Nos dois centros (CEDOC e CIB) conheci e convivi com pessoas com personalidades excepcionais que me mostraram um novo conceito de fazer ciência. À Sara Oliveira, Sofia Almeida, Lorena Esteban, e Lucía Garcia, *Pollos* e Frangos deste mundo, obrigado.

Aos meus amigos de sempre, por fazerem parte da minha vida e de a enriquecerem com muitas memórias boas, mas especialmente por tornarem fáceis os momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de faculdade que me acompanharam desde a licenciatura ao mestrado, por todos os momentos de convívio, descontração e gargalhadas partilhadas em alturas complicadas da vida de um FCTense.

Gostaria de agradecer à minha família, por todo o apoio que me deram ao longo do meu percurso académico e por me ajudarem a ser a pessoa que sou hoje, mas em especial à minha mãe e à minha avó materna por me terem ensinado a nunca desistir e encarar todas as adversidades como novos desafios ou aventuras. Às duas, o meu sincero obrigado.

A todos, muito obrigado!

Resumo

A hipóxia-isquémia e reperfusão (HIR) cerebral provoca lesões graves que podem culminar na morte de células neurais. No entanto, vários estudos demonstram que a autofagia é activada durante um insulto de HIR no cérebro e que esta pode ser protectora. Recentemente, o monóxido de carbono (CO) tem sido alvo de interesse, devido às funções que este gás desempenha no organismo, entre as quais, a sua capacidade neuroprotectora por pré-condicionamento contra *stress* oxidativo (uma das consequência da HIR).

É no âmbito destas evidências que surge esta dissertação de mestrado, onde se propôs estudar **(i)** se o CO activa a autofagia e **(ii)** se esta participa no mecanismo pelo qual o CO é citoprotector. O primeiro objectivo foi explorado em dois tipos celulares distintos, linha celular HeLa GFP-LC3 (*proof of concept*) e culturas primárias de astrócitos. Por sua vez, o segundo objectivo foi estudado em astrócitos, que são o alvo principal deste trabalho.

Nas células HeLa GFP-LC3, com base em dados preliminares, observou-se que o CO induz ligeiramente autofagia para uma concentração de 50µM entre 1h e 6h após a sua adição.

Em astrócitos utilizaram-se as condições de CO previamente estabelecidas no laboratório para limitar a morte celular e como tal, verificou-se que CO na concentração de 50µM induz a autofagia ao fim de 3h. Em astrócitos com a autofagia inibida (química e geneticamente), o CO não conseguiu resgatar estas células de morte após um insulto oxidativo provocado pelo agente *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP), pelo que, a autofagia é um processo fundamental para que o CO possa proteger os astrócitos.

Por comparação entre a linha celular HeLa GFP-LC3 e as culturas primárias de astrócitos foi possível concluir que o CO induz de forma mais eficiente a autofagia acima do nível basal celular em astrócitos.

Palavras-chave: Cérebro; *Stress* oxidativo; Autofagia; Monóxido de carbono; Pré-condicionamento.

Abstract

Cerebral hypoxia-ischemia and reperfusion (HIR) is the main cause of brain damage which may culminate in neural cell death. However, several studies have shown that autophagy is activated during a cerebral HIR insult and has a cytoprotective effect. Recently, the molecule of carbon monoxide (CO) has been a target of interest, due to the functions this gas performs in the organism. Among those, its neuroprotective function through preconditioning against oxidative stress (one of the consequences of HIR).

It is in line with these evidences that this master dissertation has emerged, where it has been proposed to study **(i)** if CO activates autophagy and **(ii)** if this process participates in the mechanism by which CO is cytoprotective. The first objective was studied in two different cells, in HeLa GFP-LC3 cell line (proof of concept) and in primary cultures of astrocytes. While the second aim was only studied in astrocytes, which are the main target of this project.

Regarding the first aim for the HeLa GFP-LC3 cell line, preliminary data indicates that CO induces slightly autophagy at a concentration of 50 μ M between 1h and 6h after treatment.

In astrocytes, CO was administered according to the laboratory pre established conditions to limit cell death, thus, it was found that CO at 50 μ M induces autophagy after 3h of treatment. Moreover, in astrocytes with autophagy inhibited (chemical and genetically), CO was not able to rescue them from death following an oxidative insult caused by the tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) agent, which demonstrates that autophagy is fundamental for CO cytoprotective mode of action against oxidative stress.

By comparing the HeLa GFP-LC3 cell line and the primary cultures of astrocytes it is possible to conclude that CO induces more efficiently autophagy above cell's basal level in astrocytes.

Keywords: Brain; Oxidative stress; Carbon monoxide; Autophagy; Preconditioning.

Índice de Matérias

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas.....	xxi
Índice de Esquemas.....	xxiii
Lista de Abreviaturas	xxv
1. Introdução.....	1
1.1. O sistema nervoso e o cérebro	1
1.1.1. Os neurónios	2
1.1.2. As células da glia.....	2
1.1.2.1. Os astrócitos.....	3
1.1.2.2. A microglia	5
1.1.2.3. Os oligodendrócitos	5
1.1.3. A barreira hematoencefálica	6
1.2. Hipoxia-isquémia cerebral	6
1.2.1. Acidente vascular cerebral.....	6
1.2.1. Modelo patológico: Hipóxia-Isquémia e Reperusão	7
1.2.1.1. Papel dos astrócitos em resposta a HIR.....	7
1.3. Morte celular	8
1.3.1. A apoptose	8
1.3.2. A autofagia	9
1.3.3. A necrose	12
1.4. Espécies reactivas de oxigénio.....	13
1.5. Pré-condicionamento.....	14
1.6. Monóxido de carbono	16
1.6.1. Monóxido de carbono e ROS mitocondrial	17
1.6.2. Monóxido de carbono e sistema nervoso central.....	18
2. Objectivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	25

3.1. Meios e material de cultura.....	25
3.2. Esterilidade	25
3.3. Material biológico	25
3.3.1. Isolamento de astrócitos corticais	26
3.3.1.1. Manutenção da cultura primária de astrócitos	27
3.3.2. Linha celular HeLa GFP-LC3	28
3.3.2.1. Manutenção da linha celular HeLa GFP-LC3.....	28
3.4. Preparação das soluções de monóxido de carbono	28
3.5. Processo de plaquear células.....	28
3.6. Reagentes Químicos	29
3.6.1. Monóxido de carbono	29
3.6.2. Indutores de autofagia	29
3.6.3. Inibidores de autofagia.....	29
3.6.4. Indução de morte celular	30
3.7. Citometria de fluxo	31
3.7.1. Determinação de autofagia por GFP-LC3	31
3.7.2. Determinação da viabilidade celular em astrócitos – inibição química	33
3.7.3. Determinação da viabilidade celular em astrócitos - inibição genética	34
3.8. <i>Western blot</i> (WB)	35
3.8.1. Técnica de <i>western blot</i>	36
3.9. Microscopia de fluorescência.....	37
3.10. Análise estatística	39
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Estudo do efeito do monóxido de carbono como indutor de autofagia em HeLa GFP-LC3	43
4.1.1. Estudo cinético de indução de autofagia por rapamicina e EBSS	43
4.1.1.1. Rapamicina.....	44
4.1.1.2. Meio Earle´s Balanced Salt Solution.....	46
4.1.1.3. Teste de indução de autofagia com monóxido de carbono	49
4.1.2. Estudo dos níveis proteicos após indução de autofagia	53
4.1.3. Estudo quantitativo de indução de autofagia	59
4.1.3.1. Teste de indução de autofagia para o meio <i>Earle´s Balanced Salt Solution</i>	59

4.1.3.2. Teste de indução com monóxido de carbono	61
Após monitorização da cinética do controlo, foi realizado o mesmo estudo para o CO.	61
4.2. Estudo do efeito do monóxido de carbono como indutor de autofagia em astrócitos	64
4.2.1. Estudo do fluxo autofágico.....	64
4.3. Estudo da importância da autofagia no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos	67
4.3.1. Estudo do papel da autofagia por inibição química.....	67
4.3.2. Estudo do papel da autofagia por inibição genética.....	69
5. Conclusão.....	75
6. Perspectivas futuras.....	81
7. Bibliografia.....	85
8. Anexos.....	91
8.1. Anexo I.....	91

Índice de Figuras

1. Introdução

Figura 1.1. Representação de um cérebro humano e das suas respectivas regiões.....	1
Figura 1.2. Estrutura de um neurónio.....	2
Figura 1.3. Diferentes tipos de células gliais.....	3
Figura 1.4. Diferentes processos autofágicos.....	10
Figura 1.5. Esquematização simplificada das proteínas envolvidas no processo autofágico induzido por privação de nutrientes.....	11
Figura 1.6. Esquema representativo dos processos celulares que se desenvolvem no cérebro após um insulto de HIR.....	12
Figura 1.7. Modelo representativo do envolvimento da mitocôndria na biogénese do autofagossoma.....	14
Figura 1.8. Esquema figurativo de pré-condicionamento como modelo de estudo de mecanismo de neuroprotecção endógeno.....	15
Figura 1.9. Mecanismo envolvido na degradação do heme.....	16
Figura 1.10. Esquema ilustrativo do efeito do monóxido de carbono na inibição do transporte de electrões na mitocôndria.....	18

4. Resultados e Discussão

Figura 4.1. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 após exposição a rapamicina na ausência e presença de HCQ.....	44
Figura 4.2. Rapamicina induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3.....	45
Figura 4.3. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 após privação de aminoácidos na presença e ausência de HCQ	46
Figura 4.4. Meio EBSS induz autofagia em linha celular HeLa GFP-LC3	47
Figura 4.5. Imagem de figuras de citometria de fluxo de rapamicina e meio EBSS como indutores de autofagia em células HeLa GFP-LC3.....	49
Figura 4.6. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 para diferentes tempos de actuação e concentrações de monóxido de carbono.....	50

Figura 4.7. Monóxido de carbono como indutor de autofágica na linha celular HeLa GFP-LC3.....	51
Figura 4.8. Imagem de figuras de citometria de fluxo de monóxido de carbono como indutor de autofagia em células HeLa GFP-LC3.....	53
Figura 4.9. Monóxido de carbono induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3 – expressão da p62 e p-S6.....	54
Figura 4.10. Monóxido de carbono induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3 – expressão da LC3I e LC3II.....	57
Figura 4.11. Imagens representativas do Meio EBSS como indutor da autofagia.....	59
Figuras 4.12. Meio EBSS induz autofagia em linha celular HeLa GFP-LC3.....	61
Figura 4.13. Fotografias representativas do monóxido de carbono como indutor da autofagia.....	62
Figura 4.14. Monóxido de carbono como indutor de autofagia em células HeLa GFP-LC3.....	63
Figura 4.15. Monóxido de carbono induz autofagia em astrócitos – expressão de LC3I e LC3II.....	65
Figura 4.16. Autofagia: um mecanismo importante no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos - determinação por inibição química.....	68
Figura 4.17. Autofagia: um mecanismo importante no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos - determinação por inibição genética.....	70

Índice de Tabelas

1. Introdução

Tabela 1.1. Resumo dos aspectos morfológicos dos processos celulares como resposta a HIR.....	13
---	----

3. Materiais e Métodos

Tabela 3.1. Resumo dos reagentes químicos e das suas características (concentração final e tempo de exposição), bem como das técnicas e tipo celular (astrócitos e linha celular HeLa GFP-LC3) onde cada um foi utilizado.....	31
--	----

Tabela 3.2. Descrição das condições ou características dos anticorpos utilizados.....	36
---	----

Tabela 3.3. Protocolo para gel de 15% de acrilamida ($V_{total}= 15\text{mL}$ (2 géis))	37
--	----

8. Anexos

Tabela 8.1. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para o indutor químico rapamicina, obtidos após tratamento de dados.....	91
--	----

Tabela 8.2. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para o indutor químico rapamicina, obtidos após tratamento de dados.....	91
---	----

Tabela 8.3. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para a condição meio EBSS, obtidos após tratamento de dados.....	91
--	----

Tabela 8.4. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para a condição meio EBSS, obtidos após tratamento de dados.....	91
---	----

Tabela 8.5. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para o monóxido de carbono, obtidos após tratamento de dados.....	92
---	----

Tabela 8.6. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para o monóxido de carbono, obtidos após tratamento de dados.....	92
--	----

Tabela 8.7. Valores de intensidade de fluorescência das bandas obtidas nos filmes de <i>western blot</i> para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono.....	92
---	----

Tabela 8.8 Valores do número médio de autofagossomas por célula medidos através da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3, por microscopia de fluorescência para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença da condição meio EBSS.....	92
--	----

Tabela 8.9. Valores do número médio de autofagossomas por célula medidos através da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3, por microscopia de fluorescência para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono.....93

Tabela 8.10. Valores de intensidade de fluorescência das bandas obtidas nos filmes de *western blot* para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono.....93

Tabela 8.11. Valores de percentagem de morte celular em astrócitos na presença de 3-metiladenina e *tert*-butil hidroperóxido, obtidos após tratamento de dados.....94

Tabela 8.12. Valores de percentagem de morte celular em astrócitos Atg 5 *knockout* na presença de *tert*-butil hidroperóxido, obtidos após tratamento de dados.....94

3. Materiais e Métodos

Esquema 3.1. Representação do modelo experimental adoptado para obtenção de culturas enriquecidas em astrócitos.....27

Esquema 3.2. Exemplo da sequência temporal de adição dos tratamentos para 3h de actuação na linha celular HeLa GFP-LC3 para indução de autofagia.....32

Esquema 3.3. Sequência temporal de adição dos tratamentos em astrócitos para determinação da viabilidade celular – inibição química da autofagia.....34

Esquema 3.4. Sequência temporal de adição dos tratamentos em astrócitos para determinação da viabilidade celular – inibição genética da autofagia34

Esquema 3.5. Sequência temporal de adição dos tratamentos em HeLa GFP-LC3 (a) e b)) e astrócitos (c) e d)), para determinação de indução de autofagia.....35

Esquema 3.6. Sequência temporal de adição dos tratamentos na ausência de inibidor do fluxo autofágico (a)) e na presença do inibidor de fluxo autofágico (b)) para o tempo de actuação de 3h em HeLa GFP-LC3 para determinação de indução de autofagia39

4. Resultados e Discussão

Esquema 4.1. Hipótese do mecanismo de protecção proposto – inibição química.....67

Esquema 4.2. Hipótese do mecanismo de protecção proposto – inibição genética.....69

Lista de Abreviaturas

3-MA	3-metiladenina
AMPK	Proteína Cinase Activada por Adenosina Monofosfato (<i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
ATG5^{+/+}	<i>Wild type</i> para o gene Atg5
ATG5^{-/-}	<i>Knockout</i> do gene Atg5
ATG5^{+/-}	Heterozigótico para o gene Atg5
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Bec 1	Beclina 1
BSA	Albumina de Sêrum Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca²⁺	Cálcio
CMA	Autofagia Mediada por Chaperones (<i>Chaperons Mediated Autophagy</i>)
CO	Monóxido de Carbono (<i>Carbon Monoxide</i>)
CO₂	Dióxido de Carbono (<i>Carbon Dioxide</i>)
COHb	Carboxihemoglobina
CORMs	Moléculas Libertadoras de CO (<i>CO-Releasing Molecules</i>)
CuSO₄	Sulfato de Cobre
DAPI	Di-hidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modifed Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	1,4-Ditiotreitol (<i>1,4-Dithiothreitol</i>)
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ER	Retículo Endoplasmático (<i>Endoplasmatic Reticulum</i>)
CF	Citometria de Fluxo
FBS	<i>Soro Fetal de Bovino (Fetal Bovine Serum)</i>

Lista de Abreviaturas

FSC-H	<i>Forward Scatter</i>
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase</i>)
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GFP	Proteína com Fluorescência Verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HO	Heme Oxigenase
HO-1	Heme Oxigenase 1
HO-2	Heme Oxigenase 2
HO-3	Heme Oxigenase 3
HIR	Hipóxia-Isquemia e Reperfusão
HCQ	Hidroxicloroquina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogénio
HT	Heterozigótico
H₂S	Ácido Sulfídrico
K⁺	Potássio
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio Monobásico
KO	<i>Knockout</i>
LAMP2	Proteína 2 de Membrana Associada ao Lisossoma (<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 2</i>)
LC3	Cadeia Leve 3 (<i>Light-Chain 3</i>)
MF	Microscopia de Fluorescência
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato-Oxidada (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase</i>)
Na₂HPO₄	Fosfato de Sódio Dibásico

NO	Oxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOX	NADPH Oxidases
O₂⁻	Anião Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxilo
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Pré-condicionamento
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PI	Iodeto de Propídeo (<i>Propidium Iodide</i>)
PI(3)K	Fosfatidilinositol 3'-cinase (<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>)
PFA	Paraformaldeído
P/S	Penicilina/Estreptomicina (<i>Penicilin-Streptomycin</i>)
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rt-PA	Factor Ativador do Plasminogenio Tecidual Recombinante (<i>Recombinant Tissue Plasminogen Activator</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEM	Erro Padrão da Média (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superoxido Desmutase
SSC-H	<i>Side Scatter</i>
t-BHP	<i>tert</i> -butil-hidroperóxido (<i>tert-butyl hydroperoxide</i>)
TNF-α	Factor Necrótico Tumoral Alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>)
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>

Lista de Abreviaturas

UV Ultravioleta

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. O sistema nervoso e o cérebro

O sistema nervoso subdivide-se em sistema nervoso central (SNC) e em sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é composto pelo encéfalo, do qual fazem parte o cérebro, cerebelo e bulbo raquidiano e pela medula espinal, que se encontram protegidos pelo crânio e pela coluna vertebral, respectivamente. Por sua vez, o SNP define-se como um conjunto de nervos cranianos e espinais cujas ramificações alcançam todas as partes do corpo, transportando mensagens de e para o SNC [1].

O cérebro é constituído por dois hemisférios cerebrais, cerebelo e tronco cerebral e é o principal órgão do sistema nervoso (figura 1.1) [1]. Apesar de representar apenas 2% da massa corporal, recebe 20% da circulação arterial através de uma vasta rede vascular que lhe fornece os nutrientes e o oxigénio necessários [2]. Este órgão contém os centros nervosos relacionados com os sentidos, a memória, o pensamento e a inteligência e é responsável por coordenar as acções voluntárias desenvolvidas pelo indivíduo, além de comandar actos inconscientes [3].

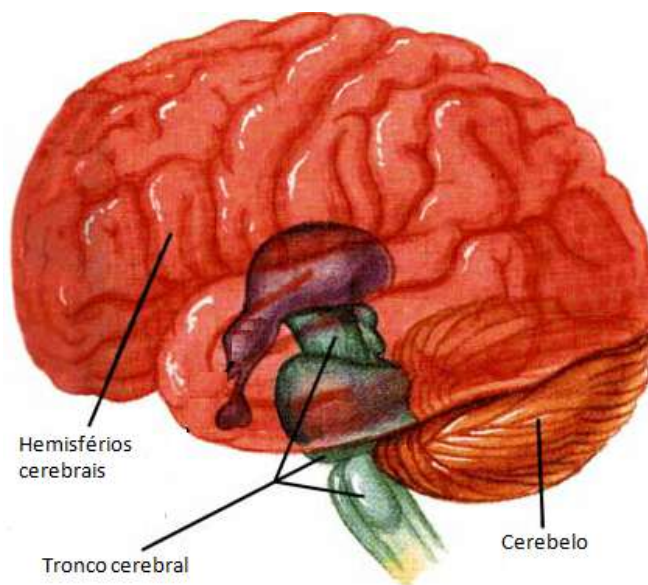


Figura 1.1. Representação de um cérebro humano e das suas respectivas regiões. Adaptado de: www.medphys.ucl.ac.uk/research/.../p25_34.pdf.

Apesar do tamanho e da ampla distribuição do sistema nervoso destacam-se dois tipos de células – os neurónios que se caracterizam como células transmissoras de informação e as células da glia responsáveis por manter e suportar a fisiologia dos neurónios, entre outras funções [4]. Ambos os tipos celulares encontram-se presentes em elevados números, no ser humano os neurónios são cerca de 100 biliões e as células gliais são aproximadamente 10 vezes esse valor [1].

1.1.1. Os neurónios

Os neurónios são células polarizadas e especializadas na transmissão de informação, que é difundida através de uma combinação de sinais eléctricos e químicos. Os sinais eléctricos são utilizados para comunicação dentro da célula, enquanto, os sinais químicos são tipicamente utilizados para transmitir informação entre neurónios [1, 4]. Os neurónios são células pós-mitóticas, ou seja, não possuem a capacidade de se dividir, o que faz com que a sua perda seja grave para o organismo [3].

Morfologicamente e de uma forma mais genérica podem-se definir três regiões principais num neurónio: **(i)** o corpo celular que suporta metabolicamente a célula, pois é o local de síntese de quase todas as enzimas, proteínas estruturais, componentes da membrana, organelos, bem como de alguns sinais químicos; **(ii)** as dendrites que são estruturas afuniladas que se ramificam a partir do corpo celular e que são responsáveis pela recepção e libertação de sinais; e **(iii)** um axónio, que é uma estrutura cilíndrica que se forma a partir do montículo localizado no corpo celular, responsável pela transmissão de informação (figura 1.2) [4]. Assim, a partir destas estruturas podem-se distinguir zonas especializadas para recolha; integração; condução e transmissão de informação, respectivamente [1].

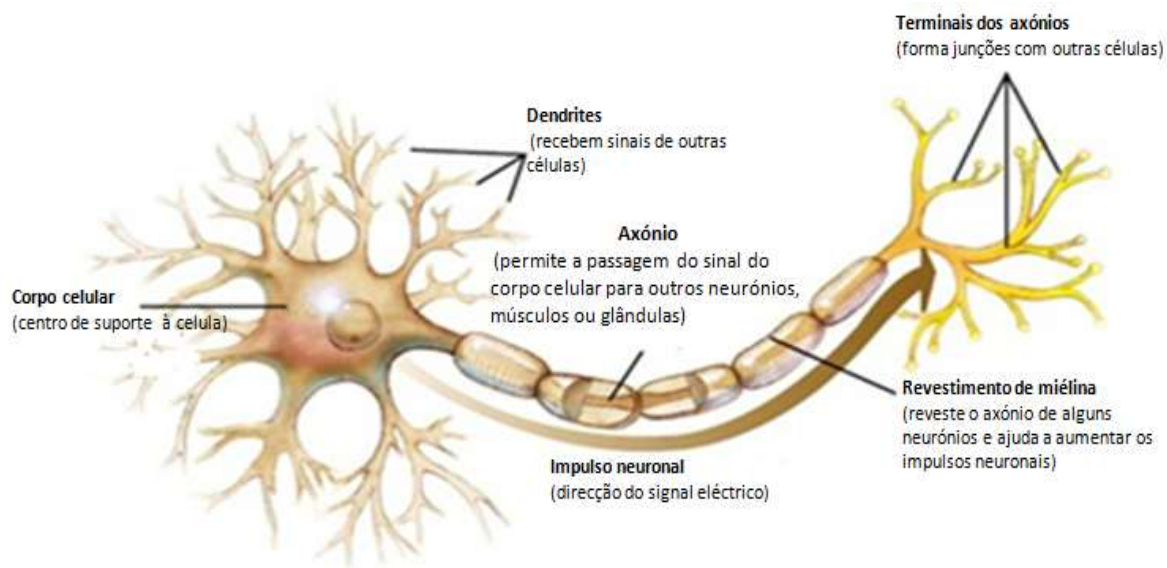


Figura 1.2. Estrutura de um neurónio. Adaptado de: <http://www.google.pt/imgres?q=neuron>.

1.1.2. As células da glia

A glia é formada essencialmente por três tipos principais de células (figura 1.3): **(i)** astrócitos, **(ii)** microglia e **(iii)** oligodendrócitos [5]. Inicialmente pensava-se que as células da glia tinham como função apenas suportar metabólica e estruturalmente os neurónios, contudo, há cada vez mais evidências que demonstram que estas células activam-se em resposta a alterações ambientais e que participam na sinalização celular [6].

A microglia e os astrócitos apresentam uma activação multi-dimensional, ou seja, a sua activação permite que estas se proliferem, fagocitem e libertem citocinas pró-inflamatórias ou

factores de crescimento. Os neurónios podem também activar as células gliais por acção de vários neurotransmissores ou moduladores, tais como glutamato ou óxido nítrico (NO) [6].

Os astrócitos e os oligodendrócitos desenvolvem-se a partir de células neuroepiteliais, no entanto, a origem da microglia permanece controversa. As células da glia estão envolvidas em todos os aspectos das funções neuronais. Durante o desenvolvimento estão envolvidas na migração neuronal e remoção de células indesejadas (microglia), na mielinização dos axónios (oligodendrócitos), na formação da barreira hematoencefálica, suporte e protecção dos neurónios (astrócitos) [5].

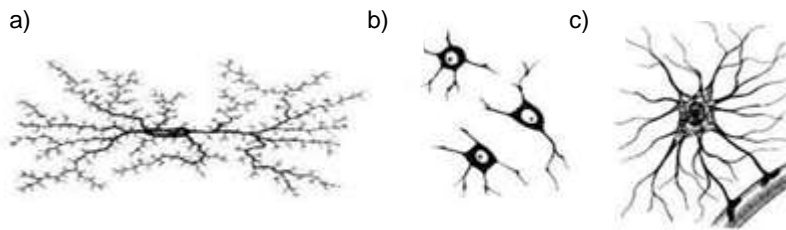


Figura 1.3. Diferentes tipos de células gliais. a) Microglia; b) oligodendrócitos e c) astrócitos. Adaptado de: http://www.uff.br/fisiovet/sistema_nervoso.htm.

1.1.2.1. Os astrócitos

Os astrócitos são células que existem em elevada quantidade no SNC e o seu número aumenta consideravelmente com a filogenia, bem como, com o aumento da complexidade do cérebro. Por exemplo, no sistema nervoso de espécies como a *Caenorhabditis elegans*, os neurónios encontram-se numa proporção aproximada de 6:1 relativamente aos astrócitos, enquanto que, por outro lado, no córtex de rato ou de murganho, a proporção é de 1:3 das mesmas células e no córtex do ser humano é de 1:7 [7].

Estas células, em forma de estrela, apresentam um corpo celular central com cerca de 15-17µm de diâmetro. As suas ramificações estendem-se em todas as direcções, permitindo deste modo que se estabeleçam interacções entre estas células através de junções de hiato¹, o que lhes permite formar redes de astrócitos. Estas ramificações também envolvem as sinapses dos neurónios, além de que, contactam com o exterior de vasos capilares. Em suma, os astrócitos agem como uma ponte entre todas as outras células do SNC, que inclui neurónios, oligodendrócitos, microglia, células endoteliais e os próprios astrócitos [6].

Junções de *hiato*¹ – Estruturas membranares especializadas que contêm grupos de canais. Esta organização requer que as membranas de duas células vizinhas estejam separadas por uma distância de 2-4 nm [5].

Os astrócitos têm como principais funções contribuir para a regulação do micro ambiente (homeostase) no qual os neurónios se desenvolvem e desempenham as suas funções, isto é, mantêm um controlo apertado na concentração de iões e neurotransmissores locais (glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA)) no espaço sináptico, regulam o pH do meio e limpam o meio extracelular, além de providenciarem substratos metabólicos como a glucose ou lactato [7]. Por exemplo, a concentração de potássio (K^+) extracelular precisa de ser regulada, uma vez que a sua acumulação pode levar a uma excitabilidade excessiva dos neurónios. Desta forma, os astrócitos incorporam este ião através de bombas de sódio/potássio ou através de canais específicos limitando a sua toxicidade [6, 7].

Estas células têm também a capacidade de libertarem para o meio factores que são benéficos para a reparação e proliferação, ao formarem uma espécie de cicatriz, ajudando deste modo células que não têm a capacidade de regeneração [6]. Entre estas factores neuroactivos destacam-se o glutamato, a adenosina trifosfato (ATP) e citoquinas, tais como, o factor necrótico tumoral (TNF)- α [7]. Uma outra característica importante dos astrócitos quando activados é o facto de apresentarem uma elevada concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}), o que permite que estes sinalizem entre si através de ondas de cálcio. Este ião, em concentrações elevadas liga-se a vários alvos moleculares, activa ou contribui para a transdução de sinal intracelular. Estas ondas de cálcio podem também propagar-se para a microglia [6].

Inicialmente foi atribuído aos astrócitos o papel de suportar fisicamente e manter os níveis de substratos metabólicos dos neurónios, contudo, recentemente foi demonstrado que, sob condições fisiológicas bem como patofisiológicas, existe uma elevada dinâmica e complexa interação entre astrócitos e neurónios que assegura a função cerebral e a sua sobrevivência [8]. Tendo em conta o papel dos astrócitos na homeostase do cérebro e a elevada cooperação metabólica que existe entre neurónios e astrócitos, disfunções a nível destas células contribuem para a formação de doenças neurodegenerativas [9]. Por outro lado, quando o cérebro sofre algum tipo de lesão (acidente vascular cerebral (AVC) isquémico ou hemorrágico, por exemplo), os neurónios são as células mais susceptíveis de sofrer danos quando comparadas com os astrócitos, pois estas apresentam menos antioxidantes endógenos e são mais sensíveis à excitotoxicidade. Os astrócitos, quer em condições normais quer após o cérebro sofrer algum tipo de insulto, suportam os neurónios ao providenciar neuroprotecção através da libertação de antioxidantes (como o glutatióno), ou de factores de crescimento ou neurotróficos, com o intuito de manter o bom funcionamento neuronal [10].

Contudo, apesar dos astrócitos serem células mais resistentes do que os neurónios, por vezes, a lesão pode afectar a sua função de suporte e protecção ou até mesmo levar à sua morte. Assim, esta incapacidade por parte dos astrócitos de exercer a sua função contribui para a amplificação da morte neuronal. Desta forma, recentemente tem havido um crescente esforço para melhorar a resposta dos astrócitos a um insulto, de forma a promover a neuroprotecção, através da comunicação específica entre astrócito-neurónio [10].

Durante muito tempo, considerou-se que os astrócitos formavam fisicamente a barreira hematoencefálica, que previne a entrada de células e de moléculas no SNC. De facto, os astrócitos constituem a barreira em algumas espécies menos complexas, contudo, em espécies mais desenvolvidas estas células são um dos constituintes, responsáveis por induzir e manter junções apertadas entre células endoteliais formando efectivamente a barreira hematoencefálica [4].

1.1.2.2. A microglia

A microglia constitui cerca de 10-20% das células da glia e representam o sistema imunitário interno do cérebro, pelo que são considerados a primeira linha de defesa cerebral. Em condições fisiológicas, a microglia ramifica-se participando no controlo do micro ambiente do SNC [6]. Uma vez na presença de substâncias anormais, tais como factores necróticos, lipopolissacáridos ou citocinas pró-inflamatórias, estas células são imediatamente activadas [6].

Durante o processo de activação, a sua morfologia altera-se de um pequeno corpo celular para um corpo celular de maiores dimensões com pseudópodes e iniciam o processo de proliferação com o objectivo de aumentar o seu número, face aos agentes agressores [6]. Através de um processo denominado de quimiotaxia², a microglia desloca-se até ao local invadido, fagocita os agentes agressores e secreta factores pró-inflamatórios que permitem um aumento da proliferação celular. Estas células não só incapacitam e removem agentes patogénicos como também ajudam na reparação de tecidos, ao secretarem para o meio factores de crescimento que facilitam o retorno homeostático. Contudo, um excesso de activação da microglia e inflamação também pode causar danos nos tecidos ou órgãos [6].

1.1.2.3. Os oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são responsáveis pela síntese de mielina. Esta, por sua vez, consiste numa folha única de plasma membranar, que se enrola de uma forma apertada em torno de um segmento de axónio conferindo protecção. Aos axónios revestidos por mielina denominam-se de axónios mielinizados [4]. Actualmente, estas células da glia têm sido alvos de estudos para o desenvolvimento de novas substâncias, facto que se deve à recente descoberta de novas funções atribuídas a estas células, tais como, a secreção de substâncias neuroactivas [11].

Quimiotaxia² - Processo através do qual as células são atraídas a um determinado local através de um estímulo químico.

1.1.3. A barreira hematoencefálica

Os vasos sanguíneos formam uma rede extremamente densa no sistema nervoso central, particularmente no córtex cerebral [4]. A esta rede protectora, que restringe as trocas de solutos entre o sangue e o cérebro, denomina-se de barreira hematoencefálica. Esta estrutura serve ainda como interface entre o sistema nervoso e o sistema imunitário, actuando como o local de encontro que permite a comunicação entre os dois [4]. Da sua composição fazem parte três tipos de células – células endoteliais, astrócitos e pericitos – e um componente não celular – a membrana basal [4].

Quando esta barreira sofre algum tipo de dano forma-se um edema³ no cérebro, o que pode levar a deficiências do foro neurológico devido a um aumento da sua permeabilidade. Este aumento pode levar à libertação para o meio extracelular de proteínas neurotóxicas (fibrina, imunoglobulinas e trombina) responsáveis pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e inflamação local, bem como, por proporcionar um transporte de nutrientes defectivo [2].

1.2. Hipoxia-isquémia cerebral

Episódios de hipóxia-isquémia cerebral causados por acidentes vasculares, traumatismos cranianos ou asfixia perinatal são considerados umas das maiores causas de deficiência neurológica em adultos e recém-nascidos [12].

1.2.1. Acidente vascular cerebral

O AVC é a terceira maior causa de morte em países industrializados a seguir a doenças cardiovasculares e ao cancro. Na sua grande maioria, os acidentes vasculares cerebrais (85%) são isquémicos, o que significa que resultam da oclusão da maior artéria cerebral por um trombo⁴ ou embolismo⁵ [13]. O outro tipo de AVC (15%) denomina-se hemorrágico, pois resulta da ruptura de um vaso sanguíneo no cérebro [13].

Na generalidade, a incidência deste tipo de lesão está prevista aumentar 12% na próxima década e de acordo com estudos recentes, cerca de 50 milhões de vidas irão perder-se até 2015 vítimas desta lesão. Por outro lado, a maioria das pessoas que sobrevivem a este tipo de incidente sofrem de deficiências graves [13].

Edema³ - Acumulação anormal de líquido no espaço intersticial [4].

Trombo⁴ - Coágulo que se forma dentro de um vaso sanguíneo.

Embolismo⁵ - Oclerização de um vaso sanguíneo ou linfático, à custa de elementos transportados pela corrente sanguínea ou linfática (ex: trombo).

Actualmente providenciar um tratamento médico eficaz após o AVC para evitar lesões cerebrais permanece um objectivo, pois até à data apenas um medicamento foi aprovado para uso clínico, o factor activador de plasminogenio tecidual recombinante (rt-PA). A desvantagem do rt-PA deve-se, à pequena percentagem dos pacientes que têm acesso a este, devido ao elevado risco de hemorragia e à curta janela temporal de actuação [13]. Para além desta abordagem, uma segunda hipótese, a hipotermia, surge como tratamento face a este tipo de lesão. Esta terapia mostrou ser bem sucedida na redução da lesão cerebral causada pela isquémia em estudos experimentais, ao reduzir a actividade metabólica e enzimática, bem como a inflamação e produção de oxidantes reactivos. No entanto, a nível clínico, este tratamento é apenas usado na hipóxia-isquémia neonatal [14].

1.2.1. Modelo patológico: hipóxia-isquémia e reperfusão

A hipóxia-isquémia tem como consequência: acidose, excitotoxicidade (pela libertação de glutamato), produção de ROS, que leva a *stress* oxidativo e por último, períodos prolongados (horas ou dias), de morte celular e inflamação [15]. A reperfusão, por sua vez, define-se como o restabelecimento da corrente sanguínea ao tecido isquémico. Apesar dos benefícios deste evento, a reperfusão também pode iniciar uma cascata de reacções adversas que levam à lesão dos tecidos. Como principais consequências destaca-se o aumento da produção de ROS, inflamação celular e entrada excessiva de cálcio nas células que culmina em morte celular [16].

As lesões causadas por hipóxia-isquémia e reperfusão (HIR) muitas vezes contrariam os mecanismos de defesa levando à morte celular por necrose ou apoptose. A necrose ocorre maioritariamente no local onde ocorreu a isquémia (centro da lesão), enquanto a apoptose ocorre em maior quantidade na penumbra do evento. De acordo com a literatura, a via apoptótica predomina quando a célula tem energia, enquanto a via necrótica predomina quando ocorre depleção de energia [17]. Um melhor entendimento dos mecanismos de protecção e de respostas celulares a lesões causadas por HIR pode levar ao desenvolvimento de novas e melhoradas terapias clínicas [18].

1.2.1.1. Papel dos astrócitos em resposta a HIR

Tradicionalmente, a pesquisa em torno de AVC focava-se apenas nos neurónios ignorando as células da glia. Actualmente sabe-se que as células gliais são vitais para o bom funcionamento do SNC e que desempenham um papel importante em condições neuropatológicas: **(i)** funções de neuroprotecção e reparação, **(ii)** protecção do restante tecido, ao removerem o excesso de glutamato, **(iii)** participação na construção e protecção da barreira hematoencefálica e **(iv)** produção de factores neurotróficos e de moléculas antioxidantes [8, 10].

Devido ao facto de apresentarem um papel complexo e multifacetado em resposta a um episódio de hipóxia-isquémia cerebral, os astrócitos são óptimos candidatos como alvos terapêuticos. Novos estudos tem sido desenvolvidos, para melhorar a resposta dos astrócitos face à lesão cerebral,

de modo a que, estes possam adoptar mais rapidamente um fenótipo pró-reparativo e de suporte neuronal. Assim, terapias clínicas futuras podem aumentar a protecção dos neurónios em caso de lesões causadas por hipóxia-isquémia [10].

1.3. Morte celular

Os tipos de morte celular podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, tais como: **(i)** processos morfológicos, que levam à morte celular por apoptose, autofagia (processo actualmente controverso) e necrose; **(ii)** processos enzimáticos, com e sem o envolvimento de nucleases ou de diferentes classes de proteases como a caspase e a catapessina, **(iii)** aspectos funcionais, podendo ser programados ou acidentais, fisiológicos ou patológicos, ou **(iv)** características imunológicas, podendo estas ser imunogénicas e/ou não-imunogénicas. Apesar dos vários critérios, o que se utiliza maioritariamente como referência à morte celular são os processos morfológicos [19].

1.3.1. A apoptose

A apoptose (morte celular tipo 1) é o processo de morte celular melhor estudado, e caracteriza-se pela condensação da cromatina e fragmentação nuclear, acompanhado da compactação de organelos citoplasmáticos. Células apoptóticas, na fase final formam pequenos corpos redondos que se encontram rodeados por membranas que contêm organelos citoplasmáticos intactos ou fragmentos do núcleo. Estes fragmentos (corpos apoptóticos) resultam de uma progressiva condensação celular e de uma eventual fagocitose por células como as células epiteliais [19]. A morte por apoptose requer energia na forma de ATP, o que faz com que a apoptose represente um processo de morte celular fortemente regulado [17].

Para que o processo apoptótico aconteça é necessária a intervenção de uma família de proteases, as caspases. As caspases classificam-se de iniciadoras ou de executoras, dependendo da sua função na cascata apoptótica. As iniciadoras são as primeiras a ser activadas e são responsáveis pela activação das executoras [20].

A apoptose pode ser activada através da via extrínseca ou intrínseca, de acordo com a origem do estímulo. Desta forma, a via extrínseca é responsável pela eliminação de células indesejadas durante o desenvolvimento e pela remoção de células detectadas pelo sistema imunitário. Por outro lado, a via intrínseca é activada para eliminação de células em resposta a radiação ionizante, fármacos quimioterápicos e moléculas externas que levam a lesões na mitocôndria. Na activação da via intrínseca, a mitocôndria fica selectivamente permeabilizada, o que leva à libertação de factores pró-apoptóticos, tais como o citocromo c e à activação de caspases [20].

1.3.2. A autofagia

Na última década, a autofagia tem sido alvo de interesse e de intensa discussão. Cada vez, é mais aceite que a autofagia é um processo de citoprotecção mais do que de morte celular. Atualmente diversos estudos mostram que células morrem **com** autofagia em vez de **por** autofagia [21, 22]. Tendo em conta qualquer uma das hipóteses, numa situação em que a célula morra por autofagia, se esta for inibida a célula sobrevive, ao passo que, por outro lado, se a célula morrer com autofagia e se esta for inibida a célula acabará sempre por morrer [22].

Enquanto a apoptose envolve a degradação rápida da estrutura celular e dos organelos, levando à morte celular; a autofagia é um termo geral que se refere a um processo dinâmico que está sempre a acontecer a níveis basais, cuidadosamente regulado e espacialmente restrito, envolvido na reciclagem de constituintes citosólicos através da sua degradação por hidrolases lisossomais [23].

A autofagia é um processo que ocorre em todos os tecidos e em todos os tipos de células e tem um papel essencial na diferenciação e desenvolvimento, em adição ao seu papel na resposta celular ao *stress* [24]. É activada durante a privação de nutrientes (especialmente aminoácidos), em condições de hipóxia, na presença de organelos danificados e agentes patogénicos, *stress oxidativo*⁶, agregados de proteínas e por altas temperaturas [23, 25, 26] e a sua desregulação está normalmente associado a doenças neurodegenerativas, cancro e infeções [23].

Este processo foi originalmente descrito como não específico, no entanto, é actualmente aceite que a autofagia é específica para determinados organelos que se encontram danificados ou em excesso como peroxissomas (pexofagia), retículo endoplasmático (ER) (reticulofagia) ou mitocôndrias (mitofagia) [23]. Recentemente foi também demonstrado que agregados de proteínas com o enrolamento incorrecto como as responsáveis pela doença de *Huntington*, podem ser selectivamente degradadas por autofagia (nomeadamente por agrefagia) [27].

A autofagia subdivide-se em três vias distintas (figura 1.4): a **(i)** macroautofagia, que das três vias é o processo melhor descrito (doravante referido como autofagia), é iniciada pela incorporação de porções citosólicas, incluindo proteínas e organelos por uma membrana isolada em formação, denominada de fagoforo. Esta estrutura pode ser gerada a partir de múltiplas origens que incluem o retículo endoplasmático, a membrana mitocondrial exterior e a membrana citoplasmática [28]. A fusão das extremidades do fagoforo origina a formação de uma estrutura fechada com dupla membrana, o autofagossoma. A membrana exterior deste vacúolo funde-se com um lisossoma (autolisossoma) e o seu conteúdo, bem como a membrana interna, são posteriormente degradados por enzimas lisossomais [23]. Na **(ii)** microautofagia, constituintes do citosol são incorporados directamente em lisossomas através de invaginações da membrana lisossomal [23], ao passo que, a **(iii)** autofagia mediada por chaperones (CMA), apenas observada em células de mamíferos, degrada selectivamente proteínas citosólicas, que contêm um motivo especificamente sinalizado, KFERQ.

⁶ *Stress oxidativo* - Resulta de uma exposição a elevadas concentrações de ROS, que não são detoxificados por agentes antioxidantes celulares.

Esta sequência é reconhecida por um chaperone específico, que permite a translocação das proteínas para o interior dos lisossomas, através da interacção com o receptor Lamp2a, proteína 2 de membrana associada ao lisossoma [23]. A autofagia e microautofagia são vias conservadas desde leveduras a mamíferos [23].

O conteúdo degradado consiste em produtos tais como aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e ácidos gordos que são depois reutilizados pela célula [29]. Em condições normais, a autofagia permite que sejam degradadas proteínas de vida longa, complementado desta forma a acção do proteossoma, que degrada proteínas de vida curta [30]. Durante períodos de privação de nutrientes a estimulação deste processo é importante, na medida em que, permite que a célula tenha acesso a aminoácidos e ácidos gordos, por forma a manter o seu metabolismo e os níveis de ATP compatíveis com a sua sobrevivência [30].

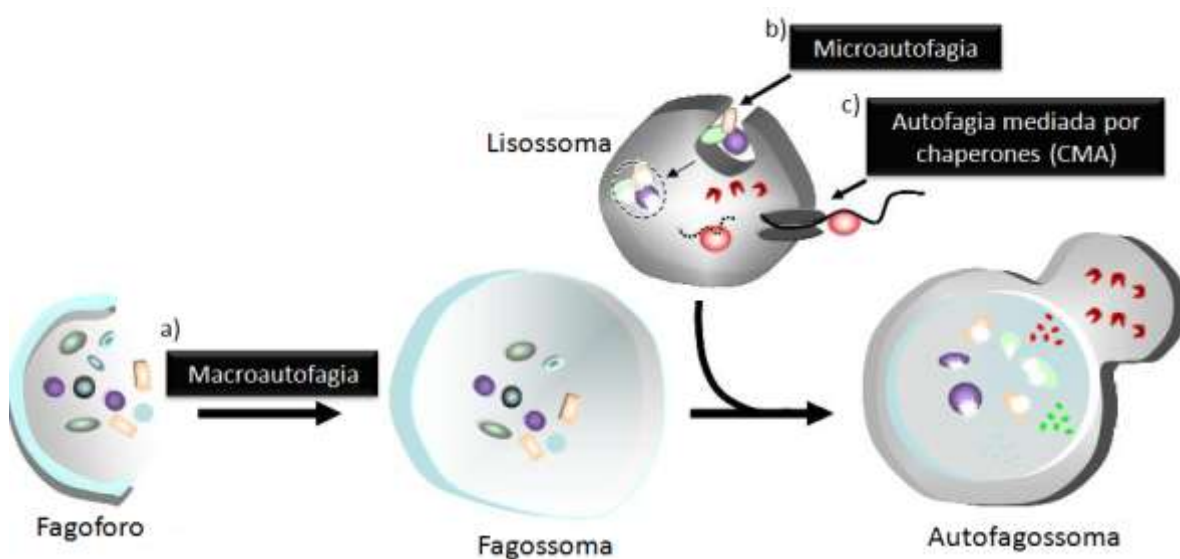


Figura 1.4. Diferentes processos autofágicos. a) Macroautofagia (autofagia), b) microautofagia e c) autofagia mediada por chaperones (CMA). Após a formação do autofagossoma o conteúdo é degradado, podendo ser novamente utilizado pela célula. Adaptado de: <http://autophagy.lu/autophagy>.

Os mecanismos básicos da autofagia foram conservados durante a evolução pois diversos organismos incluindo leveduras, insectos e mamíferos, têm presente no seu genoma um conjunto de genes ATG, apesar das diferenças significativas entre leveduras e eucariontes superiores. ATG vem da palavra inglesa *AuTophagy* [31]. Várias proteínas Atg (cerca de 18) participam na formação do autofagossoma [32] (figura 1.5), contudo, algumas tais como o complexo Atg12-Atg5 e a LC3 (*light-chain 3*) são caracterizadas de marcadores a nível bioquímico. A ubiquitinação da Atg5 e Atg12 pela Atg7 e Atg10, respectivamente, é necessária para o recrutamento de outras proteínas para a membrana do autofagossoma e para a formação do vacúolo autofágico, tal como a LC3. A LC3 é uma proteína mamífera equivalente à proteína de levedura Atg8. Esta proteína é sintetizada como pró-LC3 e clivada posteriormente pela Atg4 a LC3-I (16 kDa). Após activação da autofagia, a LC3-I é lipídada perto do C-terminal a LC3-II (18 kDa) [33], deixando um resíduo de glicina exposto para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina (PE) [34]. Estas proteínas podem ser encontradas no

citól (LC3-I) e nas membranas interna e externa do autofagossoma (LC3-II). A quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas (fluxo autofágico). Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma esta proteína é degradada [35, 36].

A Beclina 1 (Bec 1) é o ortólogo mamífero da proteína de levedura Atg6. A Bec 1 localiza-se no aparelho de Golgi, pertence ao complexo fosfatidilinositol 3'-cinase (PI(3)K) e participa na formação do autofagossoma [35]. Esta proteína está normalmente complexada com a Bcl-2, onde esta última proteína reprime a Bec 1 até a autofagia ser efectivamente activada (figura 1.5) [37].

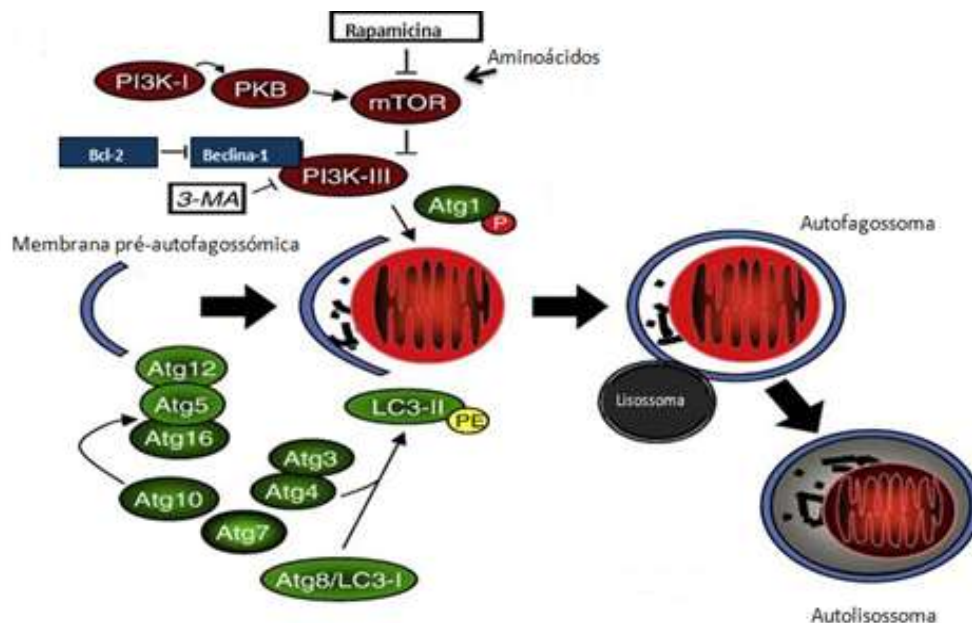


Figura 1.5. Esquematização simplificada das proteínas envolvidas no processo autofágico. Nas caixas brancas encontram-se dois agentes químicos, rapamicina e 3-MA (3-metiladenina), utilizados como indutor e inibidor da autofagia, respectivamente. Adaptado de Au, A.K., *et al.*, 2009 [24].

Por último, a p62/SQSTM1/sequestosoma-1, daqui em diante referida como p62, é uma proteína com 62 kDa, que se liga à Atg8/LC3 através de uma região denominada região de interacção LC3. Inicialmente foi demonstrado que a p62 acumula-se em murganhos com autofagia deficiente, o que sugeriu uma ligação entre a autofagia e a p62. Esta proteína é actualmente aceite como reguladora da entrega de proteínas com o enrolamento incorrecto ou de agregados de proteínas, bem como, de organelos disfuncionais para sua eliminação através de autofagia [38].

Alterações na dinâmica do processo autofágico foram observadas em várias doenças do sistema nervoso central, nomeadamente, experiências com murganhos transgénicos (*knockout* do gene Atg5 e Atg7), demonstraram que estes desenvolveram sintomas de doenças neurodegenerativas. Este facto vem sublinhar a relevância deste processo na avaliação do controlo da qualidade de proteínas e organelos celulares [17].

A autofagia é um processo que está intimamente ligado à apoptose. Sob condições de privação de nutrientes, por exemplo, a autofagia inibe a morte celular por apoptose ao providenciar metabolitos endógenos quando os nutrientes exógenos não estão presentes [35]. Por outro lado,

quando a permeabilização da membrana mitocondrial constitui um processo irreversível, a célula inibe a autofagia e activa a apoptose por acção da caspase-3, que está envolvida na destruição do domínio pró-autofágico da Bec 1 e da Atg5 [28]. Desta forma, coloca-se a hipótese da existência de uma elevada regulação entre a activação de ambos os mecanismos [35].

Durante um acidente vascular cerebral, além da necrose e da apoptose, a autofagia também desempenha o seu papel na penumbra do ferimento, pois de acordo com alguns estudos, a LC3 encontra-se em elevadas quantidades, bem como a Bec 1, que se encontra especialmente elevada em neurónios [17, 24]. No entanto, a autofagia é actualmente um processo muito controverso, pois estudos com murganhos demonstraram que uma resposta autofágica é desencadeada no cérebro por trauma, isquémia e excitotoxicidade e que a sua inibição é detrimental para este órgão [24]. Porém, após um evento isquémico, agregados de proteínas tendem a formar-se devido ao facto da actividade autofágica não ter capacidade de resposta face à quantidade de agregados, o que culmina na morte celular [33]. A autofagia como um processo protector já foi descrito num modelo cerebral de recém-nascido de rato após HIR, desta forma, surge a hipótese de que em células do cérebro a indução da autofagia pode ser considerada uma resposta protectora [33, 39].

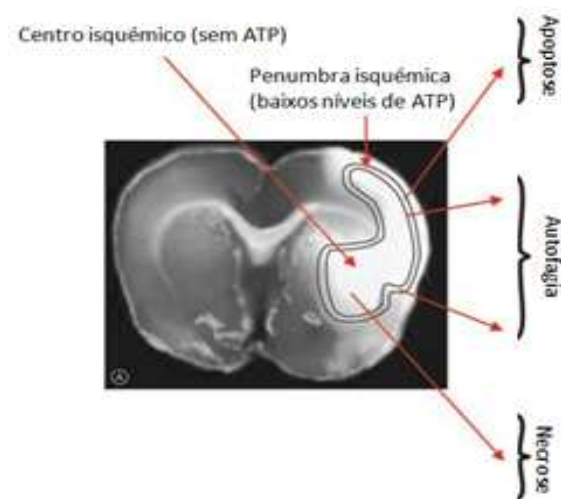


Figura 1.6. Esquema representativo dos processos celulares que se desenvolvem no cérebro após um insulto de HIR. A necrose predomina no centro isquémico, enquanto que a apoptose e a autofagia são frequentemente observadas na penumbra. Adaptado de Rami, A., *et al.*, 2008 [17].

1.3.3. A necrose

A necrose, considerado o terceiro tipo de morte celular, é normalmente definida com um tipo de morte que envolve a ruptura da membrana plasmática mas sem os marcadores bioquímicos que caracterizam a apoptose e sem a massiva formação de vacúolos (autofagia). A rápida perda de potencial membranar, que pode ser uma consequência da diminuição de ATP, de danos na membrana, ou da perda de função dos canais iónicos [40], é o que permite distinguir a necrose da apoptose. A incapacidade de manter este potencial electroquímico resulta num aumento do volume celular que finalmente culmina com a ruptura da membrana plasmática (lise celular), que leva à perda

desorganizada de organelos, bem como à libertação do conteúdo hidrolítico para o espaço extracelular, provocando à inflamação local [19].

Tabela 1.1. Resumo dos aspectos morfológicos dos processos celulares como resposta a HIR.
Adaptado de Galluzzi, L., *et al.*, 2007 [19].

Tipo de processo celular	Características morfológicas
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Arredondar da célula; • Redução do volume celular e nuclear; • Retracção dos pseudopodes; • Fragmentação nuclear; • Pequenas modificações de organelos citoplasmáticos;
Autofagia	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de condensação da cromatina; • Formação massiva de vacúolos no citoplasma (vacúolos autofágicos de dupla membrana);
Necrose	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento do volume do citoplasma; • Ruptura da membrana plasmática; • Aumento do volume de organelos citoplasmáticos; • Condensação moderada da cromatina.

1.4. Espécies reactivas de oxigénio

As ROS são moléculas pequenas, com um tempo de vida relativamente curto, mas no entanto muito reactivas. Estas espécies são produzidas por radiação ionizante de moléculas biológicas (produto secundário) resultantes da respiração mitocondrial ou são sintetizadas por enzimas específicas, como a família das nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidases, as NOX. A mitocôndria produz níveis reduzidos de ROS como uma consequência inevitável do metabolismo oxidativo, pois 1 a 3% do oxigénio não é totalmente reduzido a água, dando origem ao anião superóxido (O_2^-) que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pela superóxido desmutase (SOD). As ROS são normalmente reduzidas por agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, tais como glutationato, tioredoxina, SOD, catalases e peroxidases [23].

Elevados níveis de ROS podem ser nocivos a constituintes celulares, tais como lípidos, proteínas e ADN, e como tal representarem uma ameaça para a integridade da célula. Vários mecanismos de defesa desenvolveram-se com o objectivo de proteger as células deste *stress* oxidativo, tais como, a regulação de antioxidantes, remoção de proteínas específicas pelo sistema ubiquitina-proteossoma e remoção de proteínas e organelos danificados por autofagia [23]. A lesão cerebral por HIR está associada à produção elevada de ROS, como consequência da redução incompleta de oxigénio, que leva à formação $O_2^{\cdot-}$ e de radicais livres, tais como, o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) ou peróxidos, como o H_2O_2 [23].

Por outro lado, baixos níveis destas moléculas permitem que estas desempenhem funções de sinalização ao oxidarem factores, numa variedade de vias metabólicas que levam ao crescimento e sobrevivência, nomeadamente através da activação da autofagia, proliferação e imunidade na defesa contra microrganismos [23, 27]. Certos estudos demonstraram que ROS podem activar a autofagia através da regulação da actividade de mTOR, proteína cinase, cuja inibição activa a autofagia [41]. A falta de nutrientes leva à acumulação de H_2O_2 na mitocôndria que é essencial para a indução da autofagia, pois oxida a proteína Atg4 que é responsável pela clivagem do c-terminal da LC3 [23, 27, 42]. De acordo com estas evidências, Scherz-Shouval *et al.*, 2007, propõem a mitocôndria como a principal fonte de sinalização para a indução da autofagia, possivelmente, ao intervir na formação membranar do autofagossoma [23].

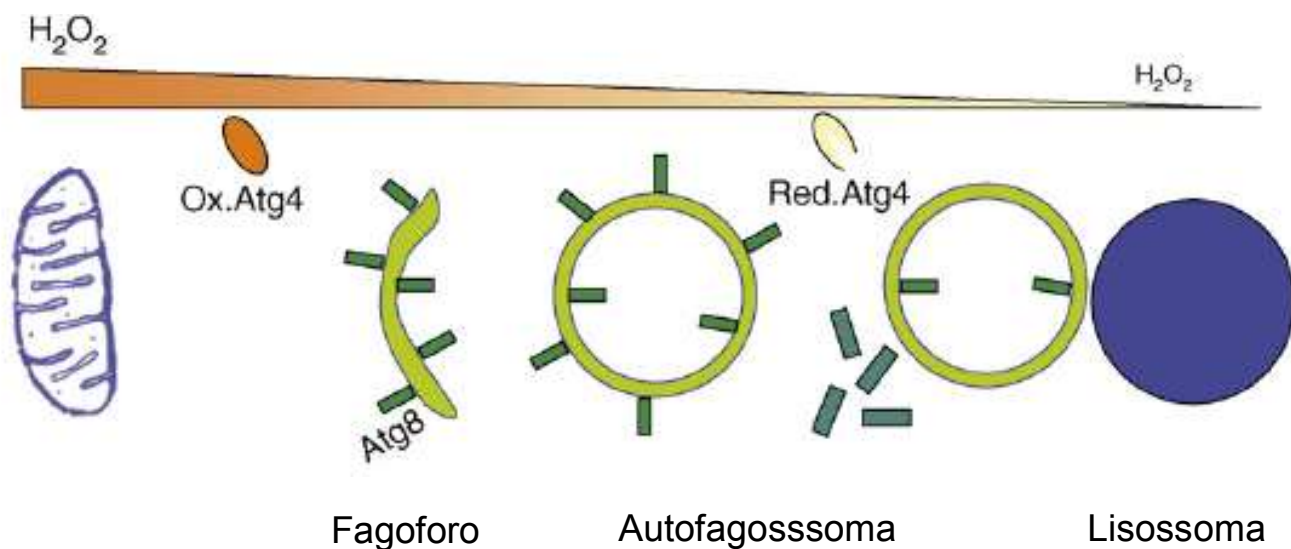


Figura 1.7. Modelo representativo do envolvimento da mitocôndria na biogénese do autofagossoma. O modelo sugere que as ROS produzidas pela mitocôndria criam um gradiente oxidativo que favorece a formação do autofagossoma na proximidade deste organelo e a sua degradação via lisossoma longe da mitocôndria onde as condições de redução prevalecem. Adaptado de Scherz-Shouval, R., *et al.*, 2007 [23].

1.5. Pré-condicionamento

Pré-condicionamento (PC) é um processo, através do qual um estímulo nocivo, abaixo do limiar de dano, é aplicado num órgão ou num tecido, que em vez de causar dano activa mecanismos de defesa

endógenos, permitindo a indução de tolerância a um estímulo posterior, que seja acima do limite normal [33]. Deste modo, este procedimento pode ser utilizado como estratégia terapêutica ao induzir tolerância em indivíduos em que episódios de isquémia possam ser parcialmente previsíveis, tais como antes de cirurgias de alto risco. Assim como em caso de recém-nascidos que tenha sido detectado sofrimento intra-uterino ou após asfixia perinatal, onde o risco subsequente de isquémia é superior [43]. Adicionalmente, estudos sobre os processos de pré-condicionamento ajudam na identificação de mecanismos endógenos de protecção e reparação.

O pré-condicionamento, na generalidade, pode proteger o cérebro devido a dois tipos de respostas: **(i)** rápido (conhecido como pré-condicionamento imediato, rápido ou clássico), que não envolve síntese proteica na sua sinalização ou **(ii)** tardio entre 1 ou 3 dias, devido ao facto de a protecção estar dependente da síntese de proteínas *de novo* (pré-condicionamento tardio) [44, 45]. A tolerância conferida por um estímulo de pré-condicionamento dura aproximadamente 15 dias no cérebro e 3 meses no coração [43].

Actualmente, o mecanismo de pré-condicionamento melhor estudado é o de pré-condicionamento isquémico (hipóxia-isquemia cerebral). Episódios isquémicos no cérebro estão entre as causas mais comuns e importantes de deficiência e morte a nível mundial, pelo que, a investigação neste campo tem como objectivo o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas [46].

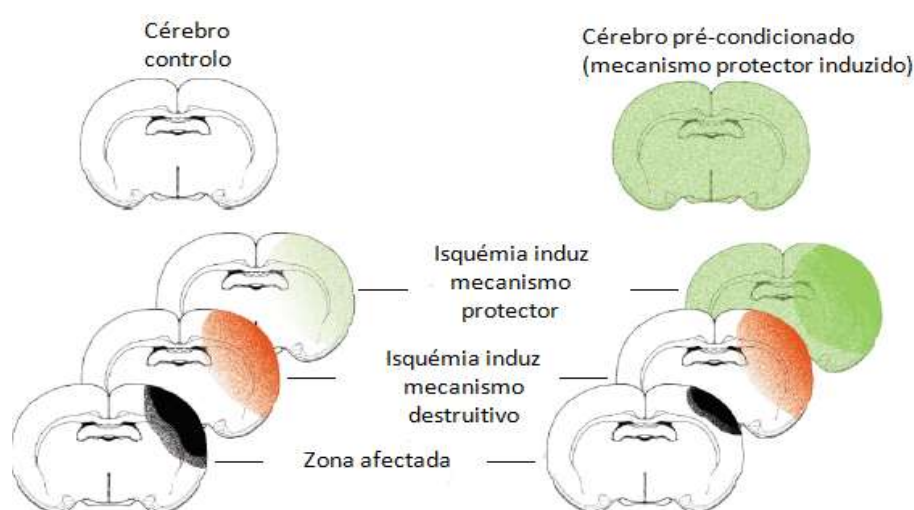


Figura 1.8. Esquema figurativo de pré-condicionamento como modelo de estudo do mecanismo de neuroprotecção endógeno. Após indução do pré-condicionamento a neuroprotecção aumenta levando a uma diminuição da zona afectada. Adaptado de Dirnagl, U., *et al.*, 2003 [45].

A nível terapêutico são conhecidas pelo menos duas substâncias, a endotoxina factor necrótico tumoral- α , e o inibidor metabólico ácido 3-nitro-propiónico, que mimetizam o pré-condicionamento isquémico, no entanto não podem ser usadas clinicamente, devido ao facto de estas serem tóxicas, bem como terem outros efeitos secundários indesejáveis [47]. Desta forma, torna-se essencial a procura de novas substâncias que sejam capazes de induzir pré-condicionamento [47].

Foi recentemente demonstrado que a autofagia, que é activada durante o processo de pré-condicionamento de hipóxia-isquémia cerebral, está associada a neuroprotecção, pois um estudo demonstrou que a inibição da autofagia com agentes químicos (3-metiladenina ou *wortmannin*) provocou um aumento da morte celular após um episódio de HIR [47, 48]. Num outro estudo, também foi publicado que a indução da autofagia por pré-condicionamento isquémico é essencial para a cardioprotecção [29].

1.6. Monóxido de carbono

Nas primeiras décadas do século XX, John Haldane descreveu pela primeira vez os efeitos fisiológicos do monóxido de carbono (CO) no corpo humano, através da sua ligação à hemoglobina [49]. Desde então, o CO tem sido visto com um “assassino silencioso” devido ao facto de exposições a elevadas concentrações deste agente causarem um aumento imediato de carboxihemoglobina (COHb) para níveis tóxicos, o que despoleta hipóxia [50].

Por outro lado, contra este dogma está o facto de que todas as células de mamíferos expressam a enzima heme oxigenase (HO), que durante a sua actividade liberta CO, que tem um papel fisiológico crucial nos ritmos circadianos e na memória. O papel vital do CO foi confirmado em organismos onde a heme oxigenase 1 (HO-1) não é expressa (gene *HMOX1*). Por exemplo, no ser humano foi reportado um caso clínico de morte prematura [49].

Existem três isoformas da HO: a **(i)** HO-1, onde a sua expressão é induzida em todos os tipos de células em resposta, por exemplo, a hipóxia ou a *stress* oxidativo, a **(ii)** HO-2 (gene *HMOX2*) que é expressa constitutivamente em células do sistema vascular e neurónios e a **(iii)** HO-3 cuja função permanece desconhecida [51]. Estas enzimas catalizam a conversão do grupo heme⁷ em biliverdina, que é acompanhado pela libertação de ferro e CO como produtos da degradação do anel tetrapirrólico [51]. Posteriormente, a biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina reductase (figura 1.9) [49]. Estima-se que cerca de 86% do CO produzido endogenamente esteja associado à degradação do heme, enquanto, o restante é formado por foto-oxidação, peroxidação de lípidos e através do metabolismo de xenobióticos [51].

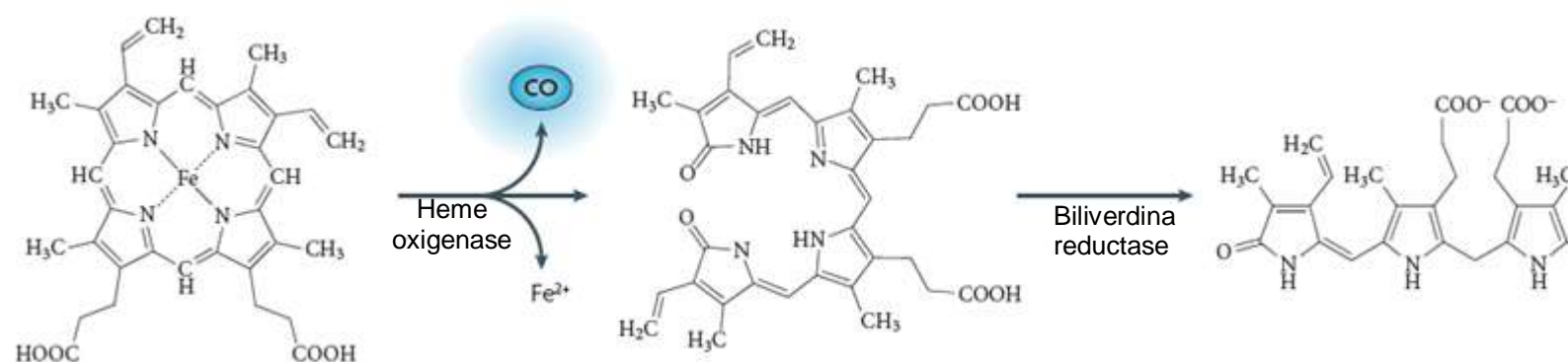


Figura 1.9. Mecanismo envolvido na degradação do heme. O heme é catalizado a biliverdina pela heme oxigenase, onde ocorre a libertação de uma molécula de monóxido de carbono (CO) e de um ião de ferro. A biliverdina é convertida a bilirrubina pela biliverdina reductase. Adaptado de Motterlini, R., *et al.*, 2010 [49].

Grupo heme⁷ – grupo prostético de várias proteínas que consiste num largo anel heterocíclico orgânico denominado de porfirina, cujo centro apresenta um átomo central de metal (por exemplo, ferro, cobre ou zinco) que serve como um sensor de gás [49].

A libertação do CO apresenta uma elevada velocidade de difusão e afinidade para alvos que contenham ferro, o que facilita a sua ligação a proteínas celulares que contêm o grupo heme, bem como para a hemoglobina presente na corrente sanguínea [49].

O simples facto de se mencionar o CO como uma molécula que apresenta potencial terapêutico despertou grande curiosidade. A vantagem de usar CO como agente terapêutico advém da sua baixa reactividade química, porque ao contrário de outros gasotransmissores como o NO e o ácido sulfídrico (H₂S) que interagem com vários alvos intracelulares, o CO reage exclusivamente com os metais de transição [49].

O CO produzido endogenamente desempenha vários papéis fisiológicos em células eucariotas. Quer o monóxido de carbono endógeno quer o exógeno, demonstraram exibir citoprotecção contra lesões vasculares, cardíacas e pulmonares, além de protegerem contra vários estádios de inflamação. Até à data, já foi publicado que o CO exibe várias propriedades: **(i)** anti-inflamatórias, **(ii)** anti-proliferativas, **(iii)** vasodilatadoras, **(iv)** antiapoptóticas e **(v)** provavelmente imunomoduladoras [50-53].

Actualmente encontra-se em desenvolvimento tecnologia para utilizar CO a nível clínico. A sua potencial utilização será através da inalação deste gás ou através da aplicação, tanto oral como injectável, de moléculas que libertam o gás em locais específicos (CORMs - *CO releasing molecules*) [49]. As CORMs, têm a capacidade de transportar e de libertar CO *in vivo* e *in vitro*, de uma maneira controlada, no tecido alvo, minimizando os efeitos tóxicos do CO devido à sua grande afinidade com a hemoglobina [49].

1.6.1. Monóxido de carbono e ROS mitocondrial

Publicações recentes demonstram que baixas concentrações de CO podem afectar a respiração, que por sua vez produzem ROS a baixos níveis com capacidade sinalizadora, levando a célula a adaptar-se positivamente [54]. Inclusive já foi demonstrado que o CO activa a autofagia num modelo de pulmão através da sinalização por ROS, limitando a lesão do tecido [55].

Actualmente, a hipótese que melhor fomenta o papel do CO a nível celular descreve que este tem como alvo a mitocôndria, em particular o complexo IV, inibindo parcialmente e transitoriamente a sua actividade e o transporte de electrões; o que leva a que haja acumulação de electrões no complexo III. Deste modo, ao nível das quinonas há produção de O_2^- , que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogénio, que funciona como molécula sinalizadora (figura 1.10) [54].

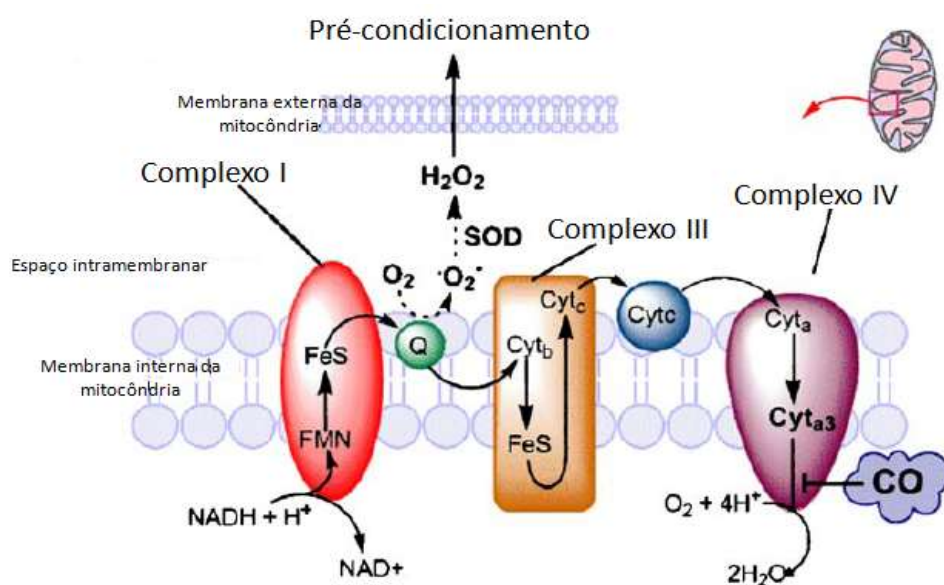


Figura 1.10. Esquema ilustrativo do efeito do monóxido de carbono na inibição do transporte de electrões na mitocôndria. Adaptado de Bilban, M., *et al.*, 2008 [50].

Assim, contrariamente à percepção comum de que o CO é uma molécula que causa danos na célula por limitar o transporte de oxigénio e a respiração mitocondrial; o ROS produzido pelo CO actua como molécula sinalizadora levando à citoprotecção [49].

1.6.2. Monóxido de carbono e sistema nervoso central

Recentemente foi publicado um artigo referente ao facto do CO apresentar propriedades neuroprotectoras nos instantes iniciais da reperfusão, após um episódio de isquémia cerebral em rato [56]. Adicionalmente, em ratos recém-nascidos pré-condicionados com CO observou-se uma diminuição de morte de células do hipocampo num modelo neonatal de hipóxia-isquémia e reperfusão cerebral [57].

O CO utilizado como indutor de pré-condicionamento já foi demonstrado em culturas primárias de neurónios [53] e de astrócitos [21, 58]. Em ambos os modelos, o CO protege estas células contra a apoptose induzida por excitotoxicidade, que é uma consequência da hipóxia-isquémia e reperfusão.

O aumento da produção de ROS surge como um processo essencial para o CO inibir a apoptose, no entanto, o mecanismo pelo qual o CO induz neuroprotecção permanece por elucidar [53]. O CO também foi usado como agente pré-condicionante ao prevenir a permeabilização da membrana mitocondrial, através da sinalização por ROS. Pequenas quantidades destas espécies reactivas são essenciais para inibir a permeabilização dos poros mitocondriais [21].

OBJECTIVOS

2. Objectivos

Os astrócitos são células que desempenham funções vitais para a sobrevivência dos neurónios, como tal, desenvolver estratégias que possam proteger os astrócitos de perder essas funções tornou-se um importante alvo de estudo. Assim, o presente trabalho tem como intuito explorar a possibilidade, de o pré-condicionamento de astrócitos por CO envolver a indução de autofagia como um mecanismo citoprotector. Utilizou-se o modelo *in vitro* de culturas primárias de astrócitos de murganhos, onde se induziu morte celular com *stress* oxidativo, que mimetiza uma das consequências da hipóxia-isquémia e reperfusão cerebral.

O trabalho encontra-se dividido em dois objectivos principais: **(i)** determinar se o CO activa a autofagia, e **(ii)** observar se a autofagia previamente activada pelo CO (pré-condicionamento) é citoprotectora após indução de morte celular.

Como o papel do CO na modulação da autofagia está muito pouco descrito na Literatura e como o sistema de culturas primárias de astrócitos é muito complexo, iniciaram-se experiências com a linha celular HeLa GFP-LC3, com o intuito de verificar se o CO induz a autofagia (primeiro objectivo). Estas experiências também vão permitir complementar se os resultados obtidos em astrócitos são reprodutíveis noutro sistema celular - *proof of concept*. Estas células apresentam a característica de expressarem a proteína GFP-LC3 que emite fluorescência verde, permitindo o uso facilitado de técnicas, tais como, citometria de fluxo (CF) e microscopia de fluorescência (MF). Assim, pretende-se observar a cinética de indução de autofagia pelo monóxido de carbono através do aumento ou diminuição da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3. Por *western blot* (WB) pretende-se também explorar os níveis de determinadas proteínas que participam em diferentes fases do processo autofágico (sinalização que dá início ao processo (p-S6) e formação do autofagossoma (p62 e LC3I/II). Numa segunda fase, o objectivo de verificar se o CO induz autofagia será estudado também em culturas primárias de astrócitos. Para tal, pretende-se observar o comportamento específico de duas proteínas autofágicas, a LC3I/II, por *western blot*.

Para atingir o segundo objectivo, astrócitos pré-tratados com CO e estando com o processo autofágico inibido são sujeitos à acção do agente *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), que induz morte celular por *stress* oxidativo. A autofagia é inibida por adição de um agente químico, o 3-metiladenina (3-MA) ou por inibição genética (ATG5^{-/-}). A viabilidade celular é determinada, então, por citometria de fluxo usando o fluorocromo iodeto de propídeo (PI).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Meios e material de cultura

Para a cultura de astrócitos utilizou-se meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), (Gibco Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 20%, 15% ou 10% (v/v) de *fetal bovine serum* (FBS), (Gibco Invitrogen, Reino Unido) de acordo com o crescimento da cultura. O meio foi também suplementado com 1% (v/v) de antibiótico *penicilin-streptomycin* (P/S) (Gibco Invitrogen, Reino Unido), 1% (v/v) de gentamicina (Gibco Invitrogen, Reino Unido), 0.2% (v/v) de glucose 6mM (Sigma, EUA) e 1% (v/v) de fungizona (Gibco Invitrogen, Reino Unido).

A linha celular HeLa GFP-LC3 foi mantida com meio DMEM, suplementado com 10% de soro FBS e 1% (v/v) de P/S, 1% (v/v) de gentamicina, 1% (v/v) de L-glutamina (Gibco Invitrogen, Reino Unido).

O crescimento dos astrócitos e das células HeLa GFP-LC3 foi realizado em frascos de plástico (*t-flask*) com superfície aderente, onde o arejamento se realiza através de filtros na tampa com poros de 0.22µm (Falcon, França).

Durante o período experimental, as células (astrócitos e HeLa GFP-LC3) foram mantidas em incubadoras (Binder, Alemanha) a 37°C, com a humidade controlada e com a atmosfera a 7% e 5% de CO₂, respectivamente.

3.2. Esterilidade

Todo o material para a preparação e manutenção das culturas primárias de astrócitos e da linha celular HeLa GFP-LC3 (meios de cultura, tampões, soluções e material de dissecação) encontrava-se estéril. A esterilização foi realizada por autoclavagem (30min para soluções e 2h para material vítreo, a 121°C e 1atm) ou por filtração (por um filtro com poros de 0.22µm). O material descartável (pipetas, *t-flasks* e tubos de centrifuga) foi fornecido em condições de esterilidade, assim como o meio DMEM e respectivos suplementos (FBS, P/S, gentamicina, glutamina e fungizona). Todo o trabalho efectuado foi realizado em ambiente esterilizado, nomeadamente, em câmaras de fluxo laminar vertical (*Labculture*, *ESCO class II*, *BSC*, Alemanha), onde o ar é mantido estéril através da utilização de um sistema de filtros HEPA e após exposição do interior da câmara a luz ultravioleta durante um período mínimo de 30 minutos.

3.3. Material biológico

Para a realização deste trabalho utilizaram-se culturas primárias de astrócitos, isoladas a partir do córtex de murganhos com 2-3 dias de vida, para a obtenção de astrócitos com genótipo *wild type* e com 18.5 dias de gestação para obtenção de astrócitos com genótipo ATG5^{-/-}. Os murganhos com 2 dias de vida foram provenientes do Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Oeiras,

Portugal, enquanto, os murganhos com 18.5 dias de gestação foram provenientes do biotério do *Centro de Investigaciones Biológicas* (CIB), Madrid, Espanha.

3.3.1. Isolamento de astrócitos corticais

A manipulação de animais foi realizada de acordo com as recomendações da Convenção Europeia para a Protecção de animais vertebrados utilizados para fins experimentais e outros fins científicos (Directiva do Conselho 86/609/CEE). Todo um esforço foi feito para minimizar o número de animais, bem como o seu sofrimento.

O protocolo utilizado para a preparação da cultura primária de astrócitos de murganhos com 2 dias de vida foi adaptado de Schousboe, A., *et al.* 2001 [59]. Antes do início do procedimento foi suplementado meio DMEM com 20% de soro FBS e 1% (v/v) de P/S, 1% (v/v) de gentamicina, 0.2% (v/v) de glucose e 1% (v/v) fungizona. Na bancada, os ratinhos foram imersos em etanol 70% (v/v) e imediatamente decapitados usando uma tesoura cirúrgica de pontas finas. De seguida, fizeram-se dois cortes laterais desde a corda dorsal até ao focinho, abriu-se o escalpe e retirou-se os dois hemisférios cerebrais com uma pinça fina, colocando-os depois num tubo onde previamente foi inserido meio DMEM 20%.

Na câmara de fluxo laminar colocou-se uma rede de *nylon* (previamente autoclavada) sobre uma placa de Petri. De seguida, os hemisférios foram colocados sobre o *nylon* e usando o êmbolo de uma seringa, pressionou-se suavemente o tecido através da rede de *nylon* para o meio de cultura (este procedimento destina-se a retirar a meninge, evitando a contaminação por outro tipo de células). Para garantir uma melhor disrupção do tecido, o meio contendo as células foi ressuspenso com uma seringa de punção lombar fina, cerca de 5 vezes. Depois deste passo as células estão prontas para serem inoculadas em *t-flasks* de 175cm² com um volume final de 30mL de DMEM 20%. Os *t-flask* foram colocados numa incubadora a 37°C e a 7% de CO₂. Em cada *t-flask* foram colocados entre 6 a 8 hemisférios cerebrais.

Após dois dias de inoculação o meio foi mudado e após o *t-flask* estar confluyente (cerca de uma semana) as células foram subcultivadas em novos *t-flasks* com uma diluição de 1:4, com vista a ter maior área de propagação celular.

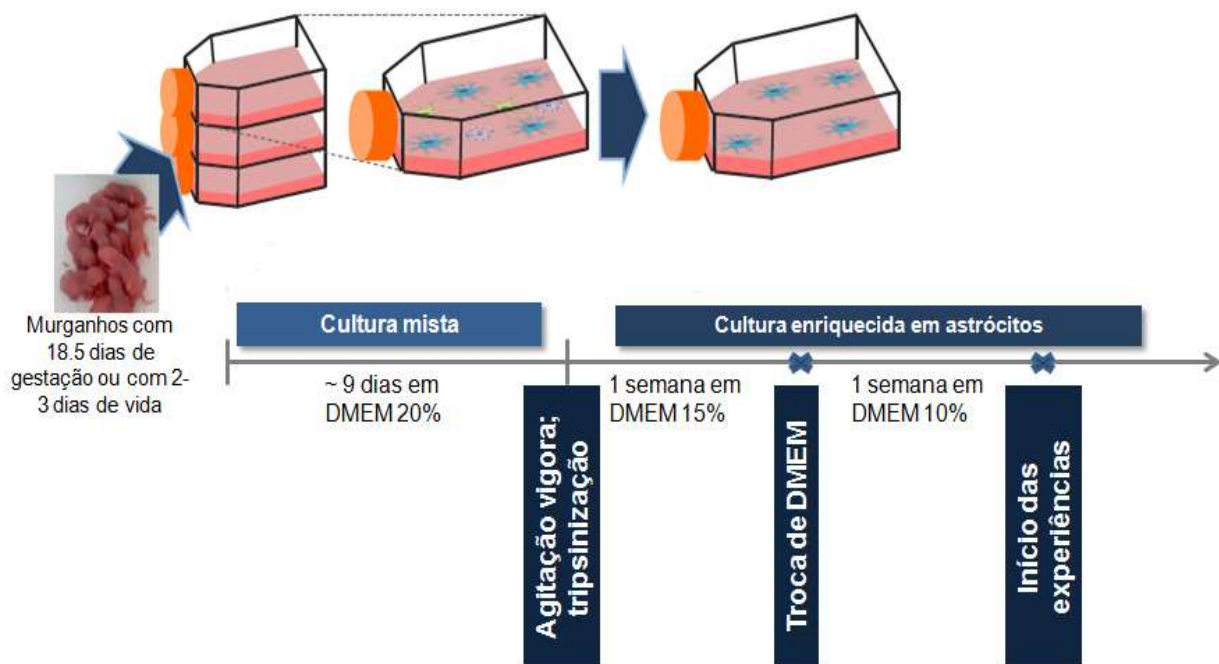
O protocolo para o isolamento de astrócitos com 18.5 dias de gestação foi optimizado a partir do protocolo anterior. Neste caso, foi necessário sacrificar a progenitora através de deslocação cervical. Os fetos foram sacrificados da mesma forma que os murganhos com 2 dias de vida. A alteração ao protocolo anterior deve-se ao facto de, os hemisférios de cada murganho serem tratados individualmente. Para isso, após a sua extracção foram colocados em *Phosphate Buffered Saline* (PBS), (50mM NaCl (Sigma, EUA), 1mM KH₂PO₄ (Sigma, Japão), 3mM Na₂HPO₄ (Sigma, EUA), a pH 7.2) e com a ajuda de uma lupa foi retirada a meninge, evitando a contaminação das culturas por outras células tais como fibroblastos. Após a meninge ser retirada, os hemisférios de cada feto foram dissociados com a ajuda de uma seringa de punção lombar fina, cerca de 5 vezes e inseridos em *t-flasks* de 75cm² e posteriormente colocados numa incubadora a 37°C e a 7% de CO₂.

A pata e a cauda de cada feto foi extraída para se realizar a genotipagem e determinar se estes são *wild type* (WT) para o gene Atg5 – ATG5^{+/+}; homozigóticos para o gene Atg5 – ATG5^{-/-} (*knockout* (KO)) ou heterozigóticos (HT) para o gene Atg5 – ATG5^{+/-}. A genotipagem foi realizada pelo técnico de laboratório Enrique Iglesias (*Centro de Investigaciones Biológicas* (CIB), Madrid, Espanha).

3.3.1.1. Manutenção da cultura primária de astrócitos

Como o objetivo é alcançar uma cultura de astrócitos o mais pura possível, após o *t-flask* estar confluyente (~9 dias), outras células (tais como oligodendrócitos) presentes na cultura de astrócitos foram separadas dos mesmos por agitação vigorosa e removidas por aspiração do meio. Para amplificação da cultura existente, adicionou-se tampão PBS aquecido para lavar o *t-flask*. De seguida acrescentou-se tripsina/EDTA (Gibco Invitrogen, Reino Unido) aquecida, de forma a cobrir toda a superfície celular (~3mL). Quando as células se encontravam todas em suspensão adicionou-se meio DMEM 15% em volume igual ou superior ao da tripsina de modo a inactivar a acção desta última. O conteúdo foi distribuído por novos *t-flasks* de modo igual e depois perfez-se o restante volume com DMEM 15% até 30mL para *t-flasks* de 175cm² e até 15mL para *t-flasks* de 75cm². Após uma semana em meio de cultura com DMEM 15%, repetiu-se o procedimento mas o meio utilizado desta vez, foi DMEM 10%. A partir desta passagem o meio usado foi sempre DMEM 10%. Os meios das culturas de astrócitos foram mudados 2 vezes por semana com distanciamento de 3 e 4 dias.

Após aproximadamente três semanas, as células estavam aptas para a realização de experiências (esquema 3.1). Para um melhor acompanhamento do crescimento e diferenciação celular, as células foram observadas regularmente no microscópio óptico invertido (*Axioverte 40 CFL*, Zeiss, Alemanha). Estas células apresentam um tempo de duplicação de cerca de 36h [60].



Esquema 3.1. Representação do modelo experimental adoptado para obtenção de culturas enriquecidas em astrócitos.

3.3.2. Linha celular HeLa GFP-LC3

As células HeLa GFP-LC3 foram cedidas pela Dra. Aviva Tolkovsky, *University of Cambridge*, Reino Unido, já transfectadas estavelmente com a proteína GFP-LC3. A transfecção foi realizada com o plasmídeo EGFP-LC3, de acordo com as especificações do kit *Lipofectamine Plus* (Invitrogen, Espanha). Apenas um clone proveniente de uma linha celular estável foi selecionado, para originar a linha celular HeLa GFP-LC3. A linha celular HeLa foi originada a partir de células do carcinoma cervical humano e apresentam um tempo de duplicação rápido (cerca de 24h).

As células encontram-se congeladas a -80°C em 10% dimetilsulfóxido (DMSO), (Sigma, Alemanha) e 90% FBS, pois este agente químico minimiza a desidratação, alterações de pH e alterações de concentração de eletrólitos associadas ao congelamento. No entanto, este químico é bastante tóxico para as células quando estas se encontram na fase de descongelação, pelo que, é necessário que os criotubos que contêm as células (cerca de 3 milhões de células) sejam descongelados em banho a 37°C e imediatamente colocadas em DMEM 10% aquecido, para limitar a perda de células. Estas foram posteriormente centrifugadas a 500g, durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas novamente em DMEM 10% e inoculadas num *t-flask*, que foi colocado numa incubadora a 37°C e a 5% de CO₂. Sempre que estivessem confluentes estas células eram passadas para um novo *t-flask*.

3.3.2.1. Manutenção da linha celular HeLa GFP-LC3

O procedimento é igual ao realizado para a cultura primária de astrócitos, com a excepção de que, o meio de cultura utilizado foi sempre DMEM 10%. É de salientar o facto de estas células como estão imortalizadas, ou seja, não apresentam inibição de crescimento por contacto, e de ter um tempo de duplicação inferior (~24h) ao dos astrócitos (~36h) foram efectuadas 2 a 3 passagens por semana.

3.4. Preparação das soluções de monóxido de carbono

As soluções de CO foram preparadas no próprio dia. Para tal, foram utilizados frascos de vidro de 10mL estéreis contendo 5mL de PBS estéril, cuidadosamente selados. O tampão foi saturado por borbulhamento de CO gás a 100% (*Air liquid* GSF, França) durante 20 minutos, a 4°C de modo a proporcionar uma concentração final de CO de 1mM [61].

3.5. Processo de plaquear células

As células foram plaqueadas em placas com número variável de poços (6 ou 24), dependendo da técnica a aplicar. O protocolo para plaquear placas é semelhante ao mencionado no ponto 3.3.1.1.. A contagem de células foi efectuada no microscópio óptico invertido na presença do corante azul tripano (Gibco Invitrogen, Escócia). Nas placas de 6 poços foram plaqueadas 300 mil células por poço, enquanto nas de 24 poços cerca de 30 mil células por poço.

3.6. Reagentes Químicos

3.6.1. Monóxido de carbono

O CO é o agente que se pretende estudar como indutor de autofagia, como tal, as experiências foram delineadas de acordo com evidências descritas na Literatura [58]. Assim, os astrócitos foram expostos a uma concentração de 50 μ M, durante 3h e 6h. Relativamente às células HeLa GFP-LC3, na Literatura existe muito pouca informação que relacione estas células com CO, como tal, três concentrações (50 μ M, 100 μ M e 200 μ M) foram inicialmente testadas e a cinética do CO foi estudada para tempos curtos (1h, 3h e 6h) [62].

3.6.2. Indutores de autofagia

Os reagentes indutores de autofagia foram usados como controlos positivos, onde as células foram submetidas a uma condição de privação de nutrientes (meio sem aminoácidos e sem suplementação, *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS) (Gibco Invitrogen, Alemanha), bem como à acção do agente químico rapamicina (Sigma, Espanha). A privação de aminoácidos é considerado o indutor clássico de autofagia ao desencadear uma cascata de sinais que culmina na activação da proteína cinase activada por adenosina monofosfato (AMPK), sendo esta a responsável por inibir a actividade da proteína mTOR, activando desde modo a autofagia. Por sua vez, a rapamicina actua directamente sobre a proteína mTOR, ou seja, desempenha a mesma acção que a proteína AMPK [63].

Para o meio EBSS, as células foram colocadas no mesmo volume que com DMEM 10% (500 μ L em placas com 24 poços e 2mL em placas com 6 poços), por forma a garantir equidade dentro da mesma experiência. Antes da adição deste meio, os poços foram lavados 3 vezes com PBS de modo a eliminar qualquer vestígio de DMEM 10%. A rapamicina foi adicionada ao meio celular envolvente, para uma concentração final de 200nM [64]. Os controlos foram testados a tempos curtos (1h, 3h e 6h), meio EBSS e rapamicina, e tempos longos (24h), rapamicina, com o objectivo de se obter também a sua cinética.

3.6.3. Inibidores de autofagia

Foram utilizados dois inibidores, o 3-MA (Sigma, Alemanha) e a hidroxicloroquina (HCQ) (Sigma, França), cada um com um objectivo específico. O 3-MA foi utilizado no início da experiência para inibir por completo o processo autofágico, ao ser responsável por inibir a classe III PI3K de proteínas, que são essenciais para a iniciação da autofagia via o recrutamento de proteínas ATG para a formação da membrana isolada do fagoforo. De uma maneira simplificada, este agente é responsável por inibir a formação do autofagossoma [65].

O 3-MA foi adicionado para uma concentração final de 10mM [65], por um período máximo de 4h, uma vez que este agente pode sinalizar outras cinases e afectar outros processos celulares tais como o metabolismo do glicogénio e a endocitose [66].

Por sua vez, a HCQ foi utilizada para inibir o fluxo autofágico com o intuito de se poder tirar elações sobre o efeito do CO, bem como dos controlos positivos (meio EBSS e rapamicina). A HCQ é uma molécula, que devido ao facto de ser uma base fraca é atraída para o interior de organelos ácidos, tais como lisossomas o que resulta num aumento do pH vacuolar, impedindo que este organelo se funda com o autofagossoma, além de inibir a acção de proteases lisossomais. Assim, proteínas como a LC3/II ou a p62 não são degradadas [67], permitindo a realização de técnicas (*western blot*, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência), que possam analisar o efeito do CO na fase final da autofagia.

Este agente foi adicionado sempre nas últimas 3h de tratamento, para uma concentração final de 30µg/mL [35]. No caso de períodos de exposição iguais ou inferiores a 3h de CO, as células foram também expostas por igual período a HCQ.

3.6.4. Indução de morte celular

Como indutor de morte celular foi utilizado um agente químico que mimetiza as consequências de um episódio de hipóxia-isquémia e reperfusão, o *t*-BHP (Sigma, EUA), ao provocar *stress* oxidativo nas células. As concentrações utilizadas variam entre 0µM, 150µM, 230µM e 320µM [58]. As células foram deixadas em *t*-BHP durante 15h, tempo ao fim do qual se inicia o protocolo para análise por citometria de fluxo.

Tabela 3.1. Resumo dos reagentes químicos e das suas características (concentração final e tempo de exposição), bem como das técnicas e tipo celular (astrócitos e linha celular HeLa GFP-LC3) onde cada um foi utilizado.

	Reagentes químicos	Tipo celular	Técnica utilizada	Concentração final	Tempo de actuação/exposição
Indutor de autofagia	CO	HeLa GFP-LC3	CF	50µM; 100µM; 200µM	1h ^(*) ; 3h ^(*) ; 6h; 24h; 48h
			WB	50µM; 100µM	3h; 24h
			MF	50µM	3h
		Astrócitos	CF	50µM	3h
			WB	50µM	3h; 6h
	Rapamicina	HeLa GFP-LC3	CF	200nM	1h; 3h; 24h
	Meio EBSS	HeLa GFP-LC3	CF	500µL	1h; 3h; 24h
			MF	500µL	1h; 3h; 6h
		Astrócitos	WB	2mL	3h; 6h
Inibidor de autofagia	3-MA	Astrócitos	CF	10mM	4h
	HCQ	HeLa GFP-LC3	CF	30µg/mL	1h; 3h
			MF	30µg/mL	1h; 3h
			WB	30µg/mL	3h
		Astrócitos	WB	30µg/mL	3h
Indutor de morte celular	t-BHP	Astrócitos	CF	0µM; 150µM; 230µM; 320µM	15h

^(*) Apenas a concentração de CO a 50µM foi testada para 1h e 3h.

3.7. Citometria de fluxo

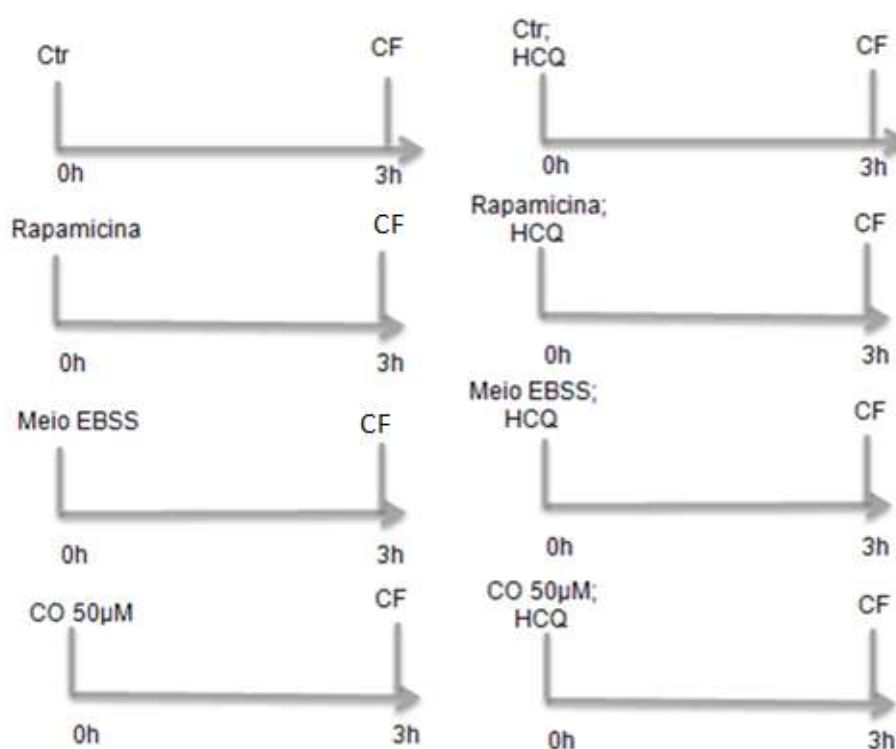
3.7.1. Determinação de autofagia por GFP-LC3

A CF é uma técnica que permite simultaneamente medir e analisar múltiplas características físicas de células individuais, à medida que passam por um feixe de luz. De entre as propriedades medidas (tamanho, granulosidade relativa ou complexidade interna, e intensidade de fluorescência relativa), a fundamental para determinar se o CO induz a autofagia foi a fluorescência relativa.

Através da perda de fluorescência da proteína GFP-LC3, é possível medir a actividade ou fluxo autofágico, ou seja, quando se pretende induzir a autofagia acima do nível basal, há inicialmente um aumento dos níveis proteicos da proteína GFP-LC3, que aumentam o número de autofagossomas na

célula, o que se traduz num aumento da intensidade de fluorescência emitida. Após fusão dos autofagossomas com os lisossomas há uma diminuição do sinal de fluorescência em relação ao controlo, devido ao facto do pH ácido dos autolisossomas levar ao decaimento da fluorescência da proteína GFP-LC3 (*quenching*). Por outro lado, na presença de inibidores do fluxo autofágico, observa-se um aumento de fluorescência relativa, quando comparado com o controlo [68]. A observação de cada uma destas fases pode depender do indutor utilizado, bem como do tipo celular.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e expostas a CO, rapamicina e a meio EBSS de acordo com as concentrações e tempos definidos na tabela 3.1. Para controlar o fluxo autofágico foi adicionada HCQ. A solução saturada de CO foi preparada de acordo com o ponto 3.4.. O esquema 3.2 apresenta um exemplo da ordem de adição de cada reagente utilizado para 3h de tratamento.



Esquema 3.2. Exemplo da sequência temporal de adição dos tratamentos para 3h de actuação na linha celular HeLa GFP-LC3 para indução de autofagia. As experiências foram realizadas por citometria de fluxo (CF). No caso das experiências a 3h a HCQ é adicionada ao mesmo tempo que a rapamicina, meio EBSS e CO. Abreviaturas: Ctr: controlo; meio EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM.

Após as células serem expostas aos agentes químicos referidos, o sobrenadante foi retirado de cada poço para um correspondente tubo de citometria de fluxo, e imediatamente lavado com 100µL PBS, de modo a retirar qualquer resto de meio. O PBS da lavagem foi também adicionado ao respectivo tubo de citometria de fluxo. Posteriormente adicionou-se 100µL de tripsina a cada poço e incubou-se durante 3 minutos a 37°C. Quando as células já não se encontravam aderentes, a acção da tripsina foi parada com o conteúdo do respectivo tubo de citometria. Uma vez colocado o conteúdo de cada poço nos tubos correspondentes, estes foram centrifugados durante 5 minutos a 1000rpm. O

pellet é ressuspendido em 300µL de meio DMEM 10%. Antes de se iniciar as leituras foi adicionado o fluorocromo PI (Sigma, EUA) a 1µM final [21, 58] . As células são permeáveis ao PI quando já perderam parte da integridade da membrana plasmática, sinal de morte, e este intercala-se nas bases azotadas das moléculas de DNA.

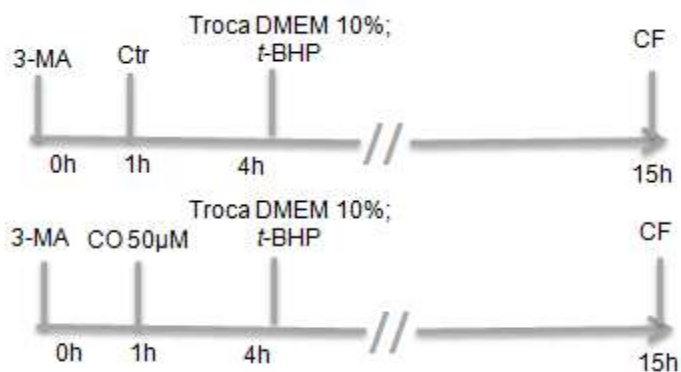
As leituras foram realizadas no aparelho FACSCalibur (Becton&Dickinson, EUA). Os sinais fluorescentes, verde (GFP-LC3) e vermelho (PI), foram lidos por um tubo fotomultiplicador após passarem através de filtros de banda, FL1 de 525nm e FL3 de 635nm, respectivamente. Os dados obtidos são trabalhados posteriormente no programa *Flowjo* e representados em figuras através do programa *Microsoft Office Excel*. As leituras de cada amostra terminam após a contagem de 5 mil eventos da população total. Optou-se por contabilizar apenas 5 mil eventos totais por tubo de citometria de fluxo passado, de modo a que os tubos fossem passados num menor intervalo de tempo possível, com o intuito de minimizar diferenças entre condições. O programa *Flowjo* foi apenas utilizado para reanalisar os dados referentes à viabilidade celular, uma vez ser importante ter as populações das células vivas, mortas e em transição entre ambos os estados bem definidas.

No programa *Flowjo* os dados são abertos directamente no programa onde é definido um gráfico, com base em dois parâmetros: *forward scatter* (FSC-H) (eixo das abcissas (x)) e *side scatter* (SSC-H) (eixo das ordenadas (y)), de modo a incluir todas as populações desejadas (neste caso células vivas, mortas e em transição de um estado para o outro). Após esse gráfico ser definido, foi criada uma janela de modo a seleccionar as células mortas em função dos filtros utilizados (neste caso o FL3) e estas definições são aplicadas aos restantes dados. Os valores desejados são obtidos após o cálculo da estatística da frequência parente. A estatística da frequência parente refere-se à frequência de células com a característica FL3 a analisar, na população total da janela definida. Os resultados são apresentados em formato que possa ser aberto no programa *Microsoft Office Excel*.

3.7.2. Determinação da viabilidade celular em astrócitos – inibição química

O 3-MA, cujo efeito esperado é que iniba quimicamente a autofagia, foi utilizado com o intuito de se determinar a viabilidade celular após as células serem expostas a *t*-BHP. Para isso, as células não podem estar confluentes nem apresentar agregados.

Este agente químico foi adicionado 1h antes das células serem pré-condicionadas com CO durante 3h. Ao fim de 4h, o meio foi trocado e foi adicionado o *t*-BHP, com o objectivo de provocar *stress* oxidativo. As células permaneceram em *t*-BHP durante 15h, tempo ao fim do qual iniciou-se o protocolo para análise por CF (esquema 3.3).

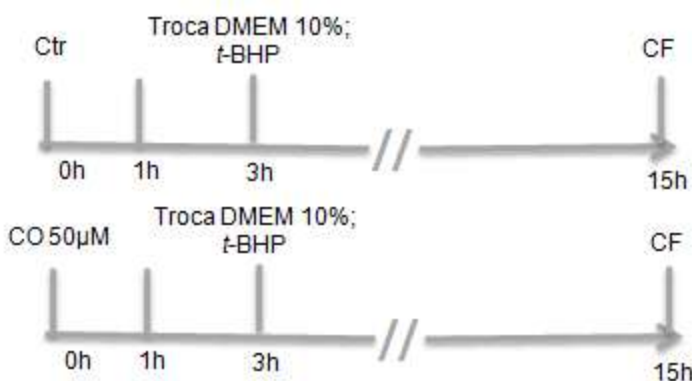


Esquema 3.3. Sequência temporal de adição dos tratamentos em astrócitos para determinação da viabilidade – inibição química da autofagia. O 3-MA foi adicionado 1h antes da adição de CO. Após pré-condicionamento de 3h por CO foi adicionado *t*-BHP às células e o seu efeito avaliado 15h depois por citometria de fluxo. Abreviaturas: 3-MA: 3-metiladenina; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; *t*-BHP: *tert*-butil hidroperóxido.

O protocolo de citometria de fluxo para astrócitos é o mesmo que, o utilizado para a linha celular HeLa GFP-LC3 e como tal, os dados obtidos são tratados como no ponto 3.7.1..

3.7.3. Determinação da viabilidade celular em astrócitos - inibição genética

Para corroborar os resultados obtidos primeiramente com inibição química, foram realizadas experiências de CF em astrócitos ATG5^{-/-}. Estas células foram tratadas exactamente da mesma forma que a referida no ponto 3.7.1., com a excepção de que, neste caso não foi adicionado inibidor químico (esquema 3.4).



Esquema 3.4. Sequência temporal de adição dos tratamentos em astrócitos para determinação da viabilidade celular – inibição genética da autofagia. Após pré-condicionamento de 3h por CO foi adicionado *t*-BHP às células e o seu efeito avaliado 15h depois, por citometria de fluxo. Abreviaturas: Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; *t*-BHP: *tert*-butil hidroperóxido.

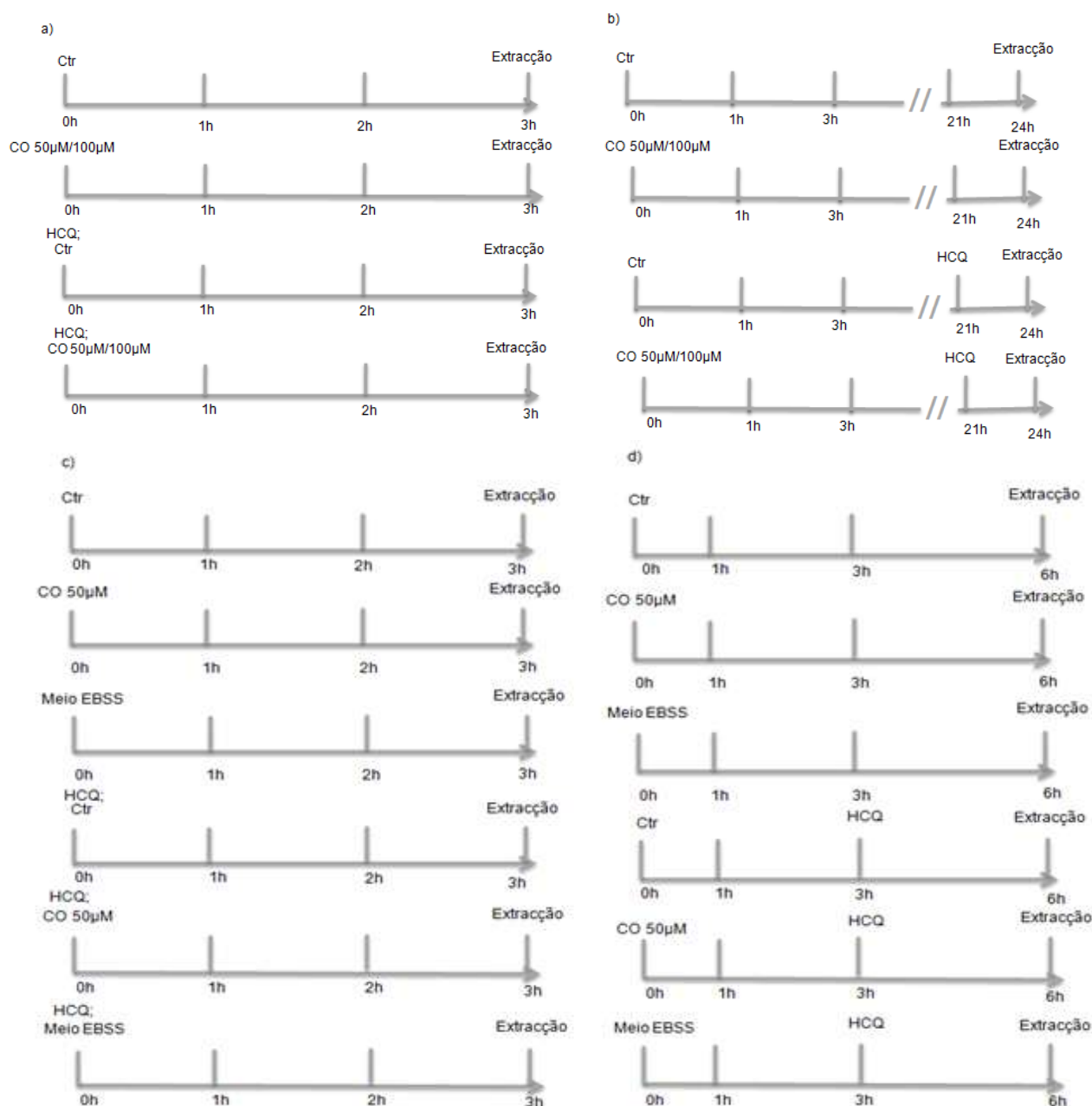
À semelhança do ponto 3.7.2. o protocolo e o tratamento de dados foi realizado de acordo com o ponto 3.7.1..

Todos os resultados de citometria de fluxo estão expressos em percentagem e em função do controlo.

3.8. Western blot

Para realizar a técnica de WB os astrócitos e as células HeLa GFP-LC3 foram plaquedadas em placas de 6 poços de forma a garantir uma quantidade elevada de proteínas.

Unicamente para astrócitos foi utilizado como controlo positivo a condição meio EBSS durante 3h e 6h, na presença e ausência de HCQ, de acordo com o esquema 3.5.



Esquema 3.5. Sequência temporal de adição dos tratamentos em HeLa GFP-LC3 (a) e b)) e em astrócitos (c) e d)), para determinação de indução de autofagia. Abreviações: Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; meio EBSS: Earle's Balanced Salt Solution; HCQ: hidroxicloroquina.

A solução saturada com CO foi preparada de acordo com o ponto 3.4..

Após os tempos referidos no esquema 3.5 procedeu-se ao passo de lise celular. Para isso, retirou-se o meio de cada poço, seguido de uma lavagem com PBS gelado (facilita a lise celular). Adicionou-se tampão de lise, cerca de 200µL por poço (2% (w/v) SDS (Sigma, Japão) e 50 mM tris-HCl (Sigma, EUA), a pH 6.8) [30]. As amostras foram colocadas em *eppendorfs* e aquecidas a 95°C durante 10 minutos e posteriormente guardadas a -20°C.

As proteínas foram quantificadas através do *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermoscientific, USA). Cada amostra foi diluída de 1/5 em tampão de lise para um volume total de 30µL. A curva padrão foi realizada com BSA (*Bovine Serum Albumin*) nas seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.25 mg/mL; 0.125 mg/mL; 0.0625 mg/mL, onde a diluição foi realizada em água milli-Q.

Em placas de 96 poços foi adicionado 10µL de cada amostra por poço e posteriormente colocou-se 200µL da mistura, na proporção de 1/50, de BCA e sulfato de cobre (CuSO₄), respectivamente. As quantificações foram realizadas em triplicado de modo a garantir equidade entre os valores. A placa foi incubada a 37°C durante 30min, tempo ao fim do qual as absorvâncias foram lidas pelo espectrofotómetro (Infinite 200 PRO, Áustria) a 540nm. Os dados obtidos foram trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*.

3.8.1. Técnica de *western blot*

Uma descrição das proteínas que se pretendem detectar por WB referentes a um aumento da autofagia, bem como dos anticorpos utilizados encontra-se listada na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Descrição das condições ou características dos anticorpos utilizados.

Proteína	LC3-I/II	p62	p-S6	GFAP	Actina	GAPDH
Peso molecular	18/16kDa	62kDa	32kDa	50kDa	44kDa	37kDa
Produção anticorpo primário	Policlonal coelho	Monoclonal coelho	Policlonal murganho	Policlonal murganho	Monoclonal murganho	Monoclonal murganho
Diluição	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000
Marca e país de origem	Sigma; França	Enzo; Alemanha	Cell signaling; EUA	Dako; Alemanha	Sigma; França	Abcam; Reino Unido

Para realização de WB, as amostras foram descongeladas e colocadas num tampão (10% (v/v) glicerol (Sigma, Alemanha), 10mM DTT (Sigma, Canadá), e 0.005% (w/v) azul bromofenol (Sigma, Alemanha)), para uma concentração final de 15µg por poço para HeLa GFP-LC3 e 25µg por poço para astrócitos.

O gel foi preparado segundo a tabela 3.3 e correu com uma amperagem fixa de 40mA, enquanto que a transferência foi realizada com uma amperagem fixa de 500mA. O tempo requerido para cada parte foi aproximadamente de 1h40 minutos e de 1h15 minutos, respectivamente. Os

tampões utilizados para a corrida (2.5mM tris base (Sigma, EUA), 150mM glicina (Appllichem, Alemanha) e 20% SDS (Sigma, Japão)) e para a transferência (190mM glicina, 25mM tris base, 20% (v/v) SDS e 10% (v/v) metanol (Sigma, Alemanha)) foram preparados no laboratório.

As membranas utilizadas são de nitrocelulose com poros de 0.45µm e capacidade entre 80 a 100µg/cm² (*Hybond-C Extra*, Amersham – Bioscience). Para confirmar a presença de bandas, corou-se as membranas com *Rouge Ponceau* (Merck, Alemanha). De seguida, as membranas foram saturadas com solução *blocking* (5% leite (Molina-leite magro) em T-PBS (50 mM tris-HCl (Sigma, EUA), 150mM NaCl (Sigma, EUA) e 0.05% (v/v) *tween 20* (Sigma, Alemanha)), durante 1h em agitação, à temperatura ambiente.

As membranas foram deixadas a 4°C *overnight* em anticorpo primário e duas horas a temperatura ambiente em anticorpo secundário (1/4000). As lavagens entre anticorpo primário e secundário foram efectuadas com T-PBS três vezes durante 10 minutos cada.

Como se pretende detectar proteínas com peso molecular baixo, como a LC3-I e LC3-II, fizeram-se géis de 15% de acrilamida.

Tabela 3.3. Protocolo para gel de 15% de acrilamida ($V_{total}= 15\text{mL}$ (2 géis)) [69].

Reagentes	H ₂ O milli-Q	30% Acrilamida (BIO-RAD, EUA)	1.5 M tris-HCl, pH=8.8 (BIO-RAD, EUA)	1 M tris-HCl pH=6.8 (BIO-RAD, EUA)	10% SDS (Sigma, Japão)	10% APS (Sigma, Japão)	TEMED (Sigma, China)
Gel de corrida	3.4mL	7.5mL	3.8mL	-	150uL	150µL	6µL
Gel de concentração	3.4mL	830µL	-	1.26mL	50µL	50µL	5µL

A revelação das membranas foi efectuada em filmes (Amersham, GE Healthcare, EUA), numa câmara escura ou no aparelho ChemiDoc (BioRad, Reino Unido), através da aplicação do *kit* de relevação *ECL Plus-Western Blotting Detection System* (Amersham, GE Healthcare, EUA).

Todos os resultados de *western blot* estão expressos em percentagem e em função do controlo.

3.9. Microscopia de fluorescência

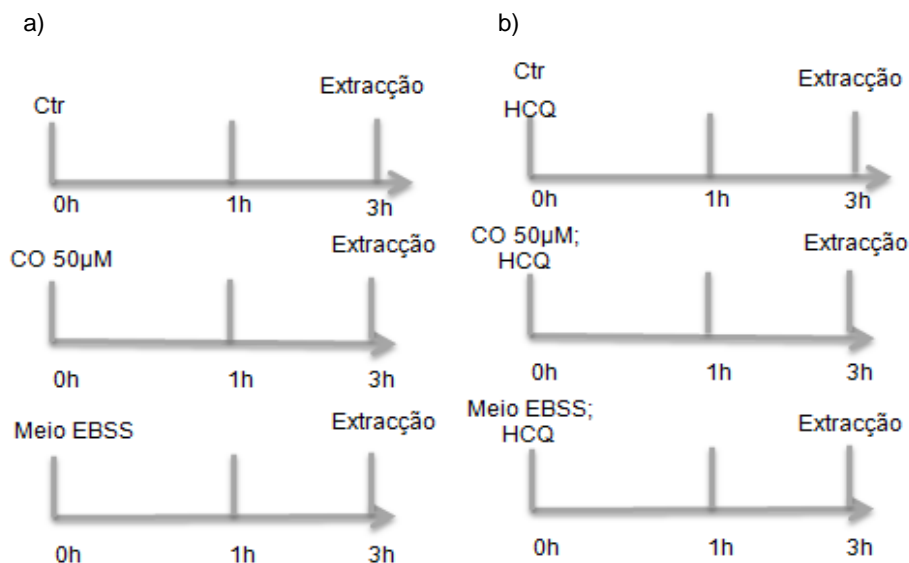
A técnica de MF tem como princípio irradiar a amostra de interesse e medir a luz emitida. Essa luz é representada por intensidade de fluorescência e é visível através de um microscópio de fluorescência. Com a utilização desta técnica pretendeu-se determinar a média do número de autofagossomas por célula através da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre uma lamela de cristal. As experiências foram realizadas com tempos de exposição a CO, meio EBSS e HCQ segundo as concentrações e os tempos do esquema 3.6.

Após os respectivos períodos de incubação, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado a cada poço 500µL de paraformaldeído (PFA) a 4% e deixado à temperatura ambiente durante 45 minutos. De seguida os poços foram novamente lavados com PBS 3 vezes, durante 10 minutos cada. Com o objectivo de ter um controlo na célula, foram marcados os núcleos com di-hidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Gibco Invitrogen, EUA) numa concentração final de 2.5µM por lamela [35]. Este corante emite fluorescência azul ao ligar-se preferencialmente ao DNA em dupla cadeia. Ao fim de 10 minutos de incubação em agitação à temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados com PBS 3 vezes durante 10 minutos cada. Nas lâminas foi colocado *fluoromount* (Sigma, EUA) que permite a aderência das lamelas à lâmina. As lamelas foram colocadas com a superfície onde as células se encontram fixas virada para o *fluoromount* e deixadas à temperatura ambiente durante 2h, tempo ao fim do qual são colocadas a 4°C. Todo o procedimento é realizado com as células protegidas da luz.

A análise de autofagossomas por célula é realizada através de fotografias tiradas pelo microscópio confocal (Leica DM IRE2, Alemanha). As fotografias são tiradas com uma objectiva de 40x/1.25-0.75 imersa em óleo, a uma distância da amostra de 0.1mm. Para excitação da proteína GFP-LC3 utilizou-se um laser de *argon* com um comprimento de onda de 488nm, enquanto que para o DAPI, utilizou-se um laser de ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 364nm.

Posteriormente, as fotografias foram enviadas para a empresa Wimassis (<http://www.wimassis.com>), especializada em análise quantitativa de imagens, com a qual existe uma colaboração, onde foram então calculados o número médio de autofagossomas por célula. Estes dados são depois trabalhados no programa *Microsoft Office Excel*, onde a partir do número médio de autofagossomas por célula por fotografia tirada foi calculado a média do número de autofagossomas por célula, por condição testada.



Esquema 3.6. Sequência temporal de adição dos tratamentos na ausência de inibidor do fluxo autofágico (a) e na presença do inibidor de fluxo autofágico (b) para o tempo de actuação de 3h em HeLa GFP-LC3 para determinação de indução de autofagia. Abreviaturas: Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; meio EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*; HCQ: hidroxicloroquina.

Todos os resultados de microscopia de fluorescência estão expressos em número médio de autofagossomas por célula.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram processados pelo programa *Microsoft Office Excel* e expressos como média aritmética e erro padrão da média (\pm SEM). A análise estatística foi realizada através do *software JMP* (SAS Institute). Utilizou-se o teste ANOVA como factor único, de modo a comparar vários grupos, com um pós-teste de acordo com o teste de Dunnett. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

Sob condições fisiológicas, a autofagia desempenha um papel fundamental à sobrevivência celular, ao providenciar suporte metabólico e ao eliminar organelos danificados e agregados de proteínas. No entanto, trata-se de um processo muito rápido e dinâmico e como tal, a sua monitorização torna-se um processo complexo. Actualmente, várias técnicas foram descritas na Literatura com o objectivo de se conseguir avaliar correctamente a autofagia, contudo, as limitações associadas a cada uma levam a que a comunidade científica continue a debater este assunto.

Para determinar se a autofagia é induzida acima do nível basal celular, recorreu-se à observação do fluxo autofágico. Este termo é utilizado para definir todo o processo autofágico ou seja, desde a síntese de autofagossomas, passando pela fase de maturação (fusão destas estruturas com os lisossomas) e terminado com a degradação dos substratos autofágicos. Optou-se por esta abordagem, uma vez que, os autofagossomas são estruturas intermediárias num processo dinâmico, onde o número de autofagossomas observado num determinado ponto do processo autofágico, resulta de um balanço entre o rácio de autofagossomas formados e de autofagossomas convertidos em autolisossomas. Assim, a acumulação de autofagossomas pode representar a indução da autofagia ou a supressão deste processo, a jusante do passo de formação de autofagossomas [66]. Por outro lado, uma diminuição de autofagossomas pode dever-se a um bloqueio da síntese proteica e não à degradação destas estruturas [66]. A HCQ foi utilizada como inibidor do fluxo autofágico (inibe a fusão dos autofagossomas), de modo a concluir-se sobre a degradação dos autofagossomas formados. É através da diferença entre a quantidade de autofagossomas acumulados na presença de HCQ e na sua ausência, que se pode concluir acerca da existência de fluxo autofágico [68].

4.1. Estudo do efeito do monóxido de carbono como indutor de autofagia em HeLa GFP-LC3

Sabendo que a autofagia é um processo muito dinâmico e rápido e que baixas concentrações de CO tem um efeito muito ligeiro, foram realizadas três técnicas distintas mas complementares (CF, MF, WB), que permitem tirar conclusões acerca da activação da autofagia por CO. O recurso a várias técnicas ajudou também, a minimizar artefactos e limitações das próprias.

4.1.1. Estudo cinético de indução de autofagia por rapamicina e meio EBSS

Com o objectivo de entender a cinética do CO, foi em primeiro lugar estudada a cinética de dois indutores de autofagia (rapamicina e condição meio EBSS) – controlos positivos. Foram escolhidos estes dois indutores, por já ter sido demonstrado pelo laboratório (dados em vias de publicação), que cada um apresenta uma cinética diferente ao longo do tempo e como tal, decidiu-se testar os dois controlos para saber com qual se assemelha a cinética do CO. Estes controlos foram testados para 1h, 3h e 24h (figuras 4.2 e 4.4). A viabilidade celular nestas condições também foi testada (figura 4.1 e 4.3).

4.1.1.1. Rapamicina

A rapamicina é um fármaco descrito na Literatura como indutor da autofagia, no entanto, a sua cinética por citometria de fluxo neste modelo, ainda não foi descrita.

Foi realizado em primeiro lugar, um estudo de viabilidade celular para testar a toxicidade da concentração descrita na Literatura (200nM [64]), de modo a garantir que a rapamicina na concentração indicada não induz toxicidade às células. A viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 em relação à acção da rapamicina foi avaliada por citometria de fluxo, para os tempos indicados (figura 4.1).

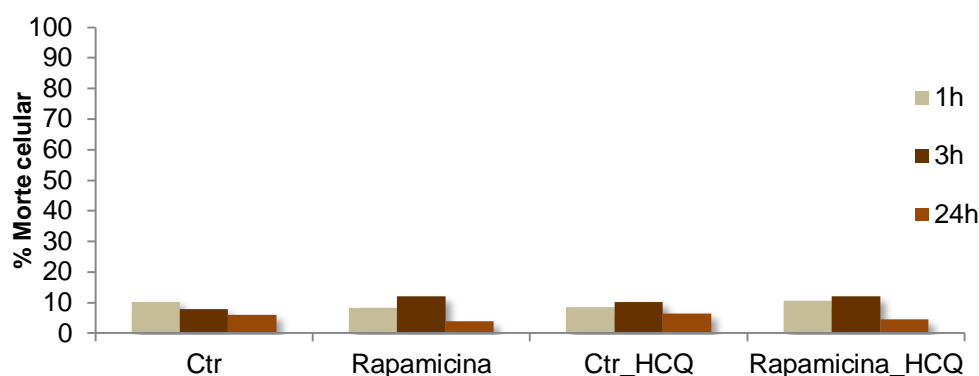


Figura 4.1. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 após exposição a rapamicina na ausência e presença de HCQ. A concentração de rapamicina final foi de 200nM. A viabilidade celular foi determinada após a adição do fluorocromo iodeto de propídeo (PI), por citometria de fluxo, para 1h, 3h e 24h ($n \leq 2$). Os resultados obtidos estão expressos como a média da percentagem de morte celular, relativamente ao total de células contabilizadas de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; rapamicina_HCQ: rapamicina com hidroxicloroquina.

Na generalidade, observa-se que as diferenças entre o controlo e a rapamicina para os vários tempos testados são muito pequenas ($\leq 5\%$) pelo que não foram tidas em consideração (anexo I, tabela 8.1). O mesmo é aplicado para as condições testadas na presença de HCQ. De acordo com os resultados da figura 4.1, pode-se concluir que a rapamicina na presença e ausência de HCQ não induz morte celular para a concentração e tempos testados.

Deste modo, para o estudo da cinética deste agente químico como indutor da autofagia, foram realizadas experiências de citometria de fluxo a todos os tempos propostos.

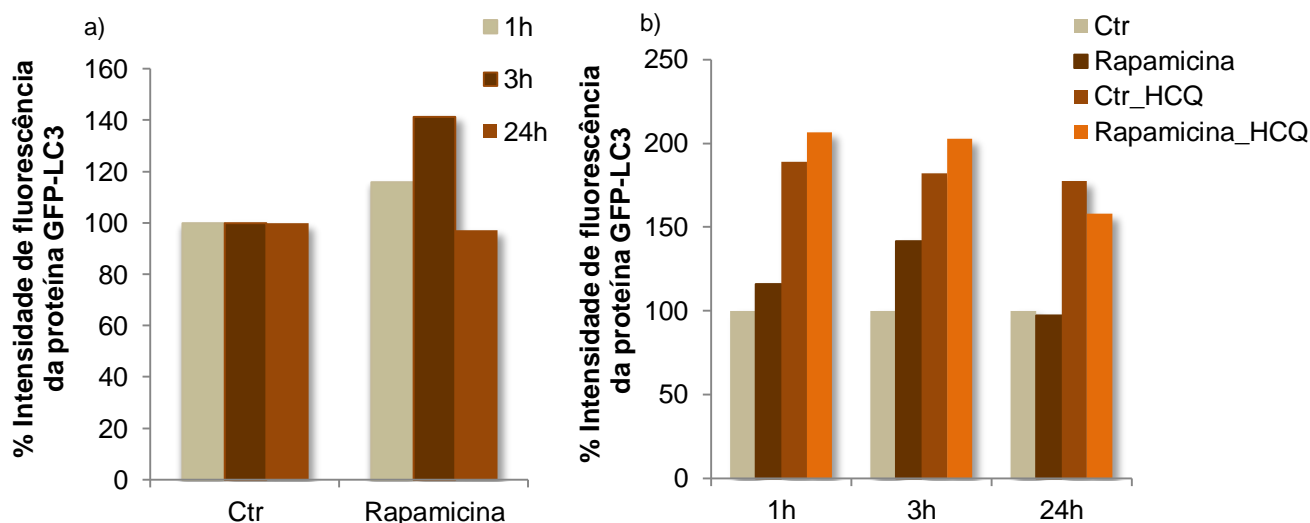


Figura 4.2. Rapamicina induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3. A rapamicina foi utilizada para uma concentração final de 200nM por condição. a) A sua cinética foi determinada por citometria de fluxo para diferentes tempos (1h, 3h, 24h e 48h) e b) a HCQ foi utilizada para bloquear proteases lisossomais com o intuito de se medir o fluxo autofágico ($n \leq 2$). Os resultados obtidos estão expressos como a média da intensidade de fluorescência de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; rapamicina_HCQ: rapamicina com hidroxicloroquina.

Na figura 4.2 a), o aumento da percentagem de intensidade de fluorescência para 1h e 3h em relação aos respectivos controlos, deve-se provavelmente à síntese da proteína GFP-LC3 e consequente formação de autofagossomas. Para 24h é visível uma diminuição dessa mesma percentagem, indicando que, possivelmente apenas se está a observar o fenómeno de *quenching* (perda de fluorescência da proteína GFP-LC3), resultante do pH ácido após fusão dos lisossomas com os autofagossomas. Tendo em consideração que os autofagossomas são estruturas intermediárias, para um melhor entendimento destes resultados recorreu-se à utilização do inibidor de fluxo HCQ.

O fluxo autofágico foi determinado com base na fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3. Assim, a figura 4.2 b) apresenta resultados na presença de HCQ (Ctr_HCQ e rapamicina_HCQ), onde observar-se a existência de fluxo autofágico para os três tempos estudados (rapamicina_HCQ *versus* rapamicina), uma vez que, há acumulação de autofagossomas. Inicialmente é visível um aumento de autofagossomas (1h e 3h) seguido de uma diminuição (24h), em relação ao respectivo controlo. É de se referir que o aumento a 1h e 3h, permite confirmar o aumento da síntese da proteína GFP-LC3 (controlo *versus* rapamicina) observado na figura anterior, que consequentemente leva ao aumento de número de autofagossomas nas células por acumulação, uma vez que, não se podem fundir com os lisossomas (controlo_HCQ *versus* rapamicina_HCQ). Com base nestes dados concluir-se que há indução da autofagia após 1h e 3h, da adição de rapamicina.

Para 24h, a rapamicina na presença de HCQ, não apresenta acumulação de autofagossomas acima do nível basal. Deste modo, propõe-se que a diminuição observada seja devido ao facto, de que entre 3h e 24h os autofagossomas começaram a ser degradados por fusão com os lisossomas e como tal, o fluxo presenciado é devida à fracção, que ainda não foi degradada,

devido à presença da HCQ. Tendo em conta o proposto coloca-se a hipótese, de que a rapamicina actue entre 1h e 24h.

Perante estes resultados conclui-se que a rapamicina nas primeiras horas induz a síntese da proteína GFP-LC3 e só posteriormente aos níveis desta proteína terem atingido um determinado limite, é que torna-se visível o *quenching*, indicativo de que o processo ocorre na sua totalidade. Para uma melhor observação dos valores utilizados na figura 4.2 deve-se consultar a tabela 8.2, no anexo I.

4.1.1.2. Meio Earle's Balanced Salt Solution

A privação de aminoácidos como indutor de autofagia através do meio EBSS é descrito na Literatura, no entanto, a sua cinética foi apenas estudada para 3h, 6h e 12h na linha celular CHO [68]. Deste modo, à semelhança da rapamicina, a sua cinética ainda não foi estudada na linha celular HeLa GFP-LC3, pelo que, foi necessário realizar o seu estudo de modo a comparar-se a cinética do monóxido de carbono com a deste controlo.

Tal como para rapamicina, a viabilidade desta condição de privação de nutrientes também foi estudada nesta linha celular.

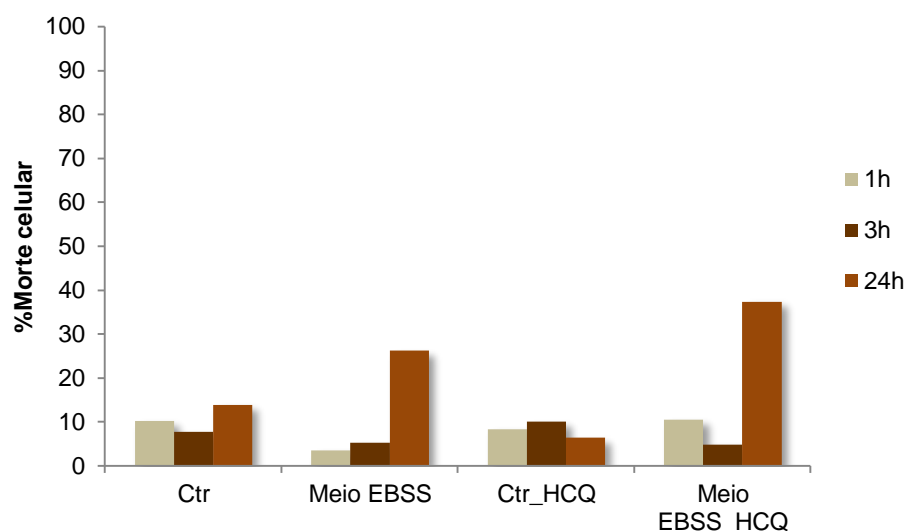


Figura 4.3. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 após privação de aminoácidos na presença e ausência de HCQ. O meio EBSS foi adicionado para um volume total de 500μL por condição. A viabilidade celular foi determinada após a adição do fluorocromo iodeto de propídeo (PI), por citometria de fluxo, para 1h, 3h e 24h (n≤2). Os resultados obtidos estão expressos como a média da percentagem de morte celular, relativamente ao total de células contabilizadas de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxiclороquina; meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxiclороquina.

Na figura 4.3 observar-se que apenas para 24h, nas condições meio EBSS e meio EBSS com HCQ, há um aumento da percentagem de morte em relação ao controlo, em cerca de 20% e 30%, respectivamente (tabela 8.3, anexo I). Este aumento deve-se ao facto da privação de nutrientes ser um indutor forte e levar assim ao rápido esgotamento das reservas celulares por autofagia, o que

culmina em morte celular. Como a 24h é visível uma percentagem considerável de morte em relação ao controlo, não foram realizadas experiências para este tempo, uma vez que, ir-se-ia estar a medir a autofagia em células não viáveis.

Assim, para o controlo positivo meio EBSS foram escolhidos tempos de 1h e 3h para se estudar a sua cinética de indução de autofagia (figura 4.4).

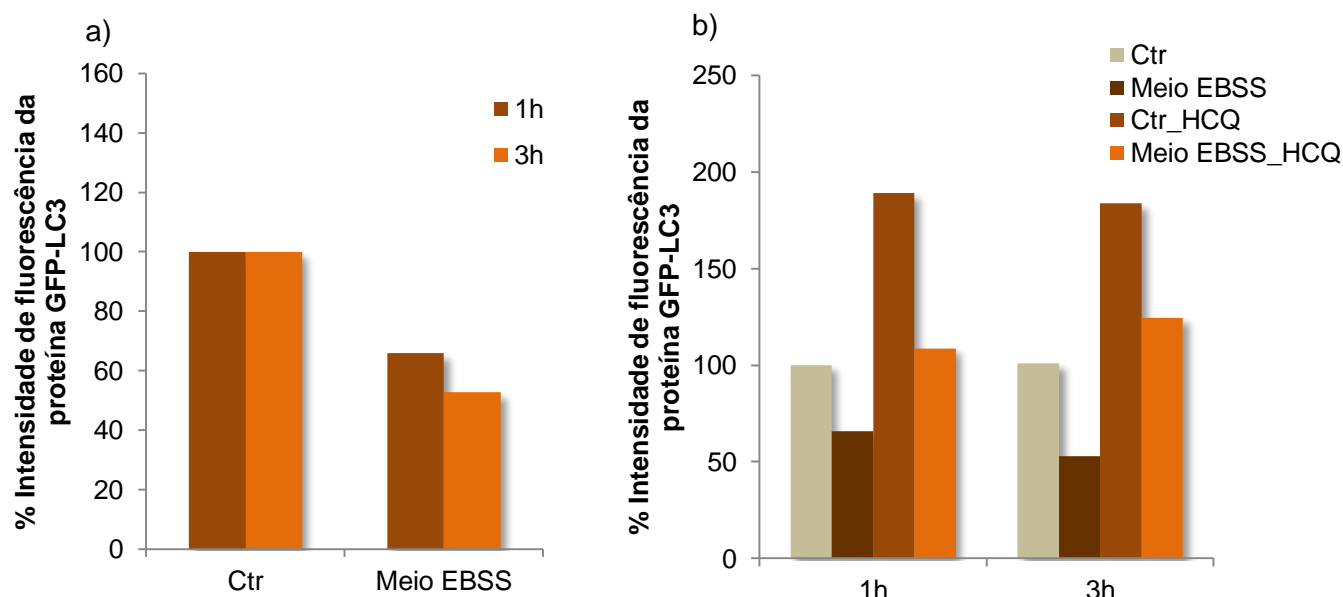


Figura 4.4. Meio EBSS induz autofagia em linha celular HeLa GFP-LC3. As células foram colocadas em 500µL de meio EBSS. a) O efeito do meio EBSS foi determinado por citometria de fluxo para dois tempos diferentes (1h, 3h). b) HCQ foi utilizada para inibir proteases lisossomais de modo a poder-se medir o fluxo autofágico ($n \leq 2$). Os resultados obtidos estão expressos como a média da intensidade de fluorescência de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviações: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxicloroquina.

Na figura 4.4 a) observa-se que após 1h e 3h há uma diminuição da percentagem de intensidade da fluorescência da proteína GFP-LC3, quando comparado com o respectivo controlo, indicativo de uma possível degradação de autofagossomas. No entanto, comparando os resultados obtidos apenas para o meio EBSS ao fim de 1h e 3h, verifica-se que, a 3h a diminuição da percentagem de intensidade é maior do que a 1h. Este comportamento demonstra que a 3h ainda há degradação de autofagossomas a ocorrer. Este resultado, apesar de estar de acordo com o descrito na Literatura e como tal, indicar que o meio EBSS tem um tempo de actuação muito rápido [68], não garante que todo processo autofágico esteja a acontecer. Assim, à semelhança do descrito para a rapamicina, esta diminuição pode ser devida a um bloqueio da síntese da proteína GFP-LC3 e não devido ao *quenching*, pelo que, é necessário verificar o que acontece na presença HCQ.

Na presença de HCQ, para o meio EBSS (figura 4.4 b)), não há acumulação de autofagossomas acima do nível basal, quando comparado com os respectivos controlos (Ctr_HCQ), para 1h e 3h. Tal facto pode ser justificado, pela rápida actuação do meio EBSS, pois a indução e finalização do processo autofágico foi de tal maneira rápida, que a HCQ não conseguiu bloquear a

tempo a formação de autolisossomas. É sabido, por testes realizados no laboratório, que a HCQ demora 3h a inibir completamente a autofagia (resultados em via de publicação), pelo que, na presença de um indutor muito forte, estes resultados são expectáveis. Por outro lado, comparando as condições meio EBSS na presença e ausência de HCQ para 1h e 3h, verifica-se que há fluxo, o que significa, que o processo autofágico não está disfuncional. Contudo, na presença de HCQ para 3h nota-se um ligeiro aumento de autofagossomas no meio EBSS, em relação ao meio EBSS para 1h, o que permite concluir que ao fim de 3h a acumulação de autofagossomas é maior, devido ao facto de, ao fim de 1h ainda haver formação de autofagossomas [68]. Estes resultados, que corroboram os obtidos na figura 4.4 a), permitem concluir que perante a privação de aminoácidos, em menos de 1h a autofagia é induzida. Para uma melhor observação dos valores utilizados na figura 4.4 deve-se consultar a tabela 8.4, no anexo I.

Com base nestes resultados, que são semelhantes aos descritos na Literatura, pode-se afirmar que esta condição de privação de aminoácidos actua a tempos curtos (processo autofágico ocorre em menos de 1h), ao apresentar uma cinética totalmente diferente da apresentada pela rapamicina, que actua a tempos longos (entre 1h e 24h). Ao contrário da rapamicina, não é visível um aumento no número de autofagossomas, apenas o *quenching* resultante da formação de autolisossomas, o que demonstra que cada estímulo utilizado para induzir a autofagia pode apresentar características distintas (tempo de indução, tempo de actuação e viabilidade).

A figura 4.5 demonstra um exemplo do tipo de gráficos que se obteve por CF para as figuras 4.2 e 4.4. Nesta figura pode-se observar que para 3h há um deslocamento da média da fluorescência para o lado direito, no caso do agente indutor rapamicina na presença e ausência de HCQ, ou seja, para valores superiores ao controlo, enquanto que, para o meio EBSS, este desloca-se para a esquerda nas duas situações, ou seja, para valores inferiores aos controlos. As imagens de cada gráfico não apresentam uma curva gaussiana na sua totalidade, uma vez que, só foram contabilizados 5000 eventos.

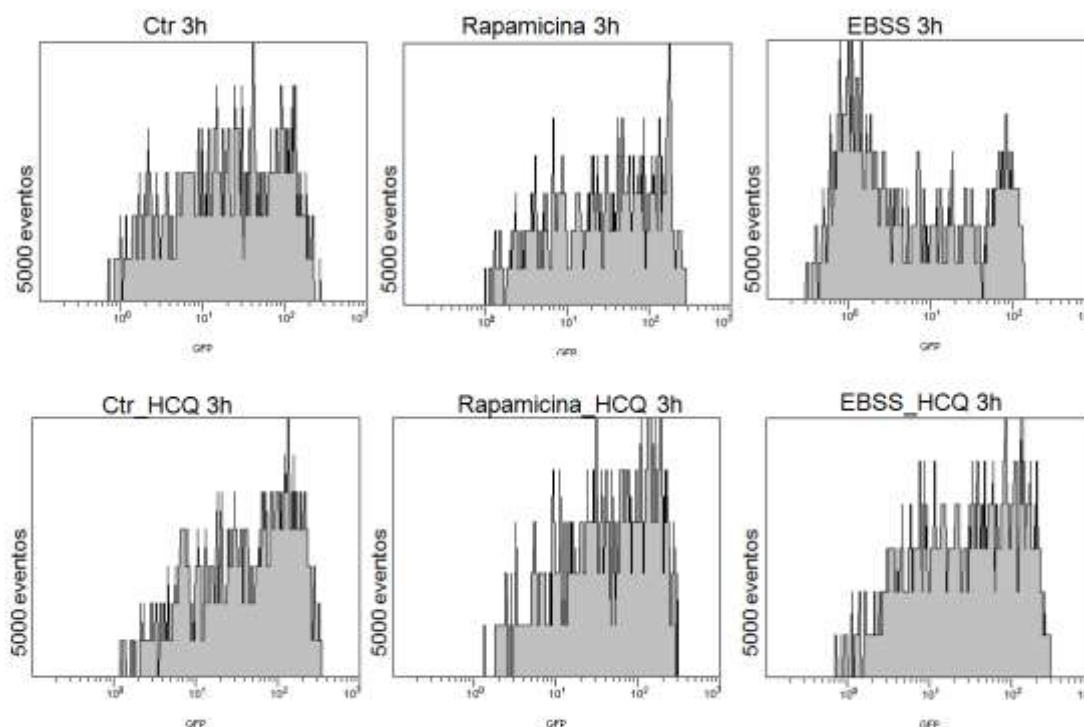


Figura 4.5. Imagem de gráficos de citometria de fluxo de rapamicina e meio EBSS como indutores de autofagia em células HeLa GFP-LC3. Gráficos de 3h mostrando diferenças entre a rapamicina e meio EBSS em relação ao controlo. A HCQ foi utilizada para bloquear a acção de proteases de modo a poder-se tirar conclusões sobre o fluxo autofágico. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxiclороquina; meio Earle's Balanced Salt Solution; rapamicina_HCQ: rapamicina com hidroxiclороquina; Meio EBSS_HCQ: meio Earle's Balanced Salt Solution com hidroxiclороquina.

4.1.1.3. Teste de indução de autofagia com monóxido de carbono

A viabilidade celular perante o CO também foi estudada nesta linha celular, pois nestas células o seu efeito ainda não foi descrito, apesar de haver um trabalho na Literatura que relaciona protecção conferida pelo CO em células HeLa [62]. Contudo, este trabalho foi feito com CO gás a 100ppm, e no caso deste estudo pretende-se utilizar soluções saturadas de CO. Assim, testou-se a viabilidade das células HeLa para as concentrações de CO descritas para astrócitos, a partir de soluções saturadas de CO, de modo a determinar qual a concentração óptima que induz a autofagia.

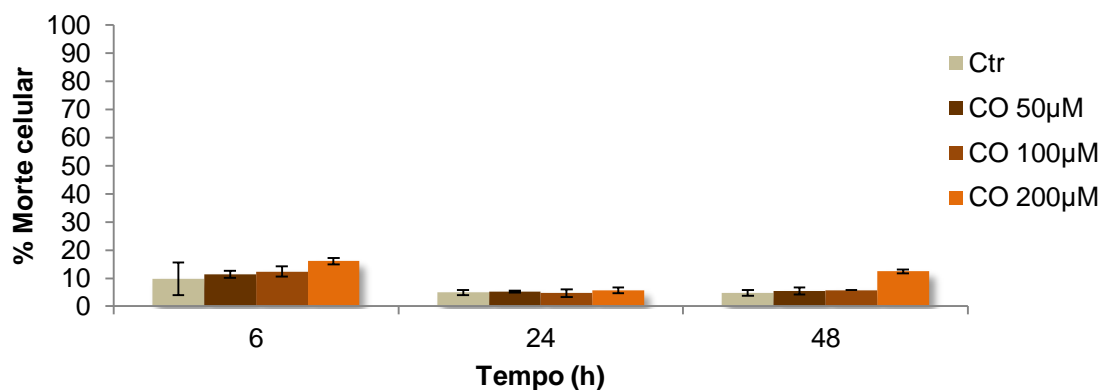


Figura 4.6. Viabilidade da linha celular HeLa GFP-LC3 para diferentes tempos de actuação e concentrações de monóxido de carbono. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo, após a adição do fluorocromo iodeto de propídeo (PI). Foram testados diferentes tempos de actuação de CO na célula, que variam desde 6h a 48h e diferentes concentrações de CO, nomeadamente 50μM, 100μM e 200μM. Os resultados obtidos estão expressos como a média da percentagem de morte celular, relativamente ao total de células contabilizadas de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviaturas: Ctr: controlo; CO 50μM: monóxido de carbono a 50μM; CO 100μM: monóxido de carbono a 100μM; CO 200μM: monóxido de carbono a 200μM.

A viabilidade celular foi testada para três concentrações de CO (50μM, 100μM e 200μM), para cinéticas de tempos curtos (6h) e longos (24h e 48h), de actuação deste gás na célula. Para os três tempos testados, nenhuma das concentrações utilizadas de CO activa vias de sinalização que induzam morte celular, para níveis superiores ao controlo. Assim, pela análise deste gráfico pode-se concluir que todas as concentrações de CO não induzem morte celular a tempos curtos e longos (tabela 8.5, anexo I).

Após confirmação de que o CO não é tóxico nas concentrações testadas para a linha celular HeLa GFP-LC3 nos tempos indicados, foi estudada a cinética de indução de autofagia para este gás, por CF.

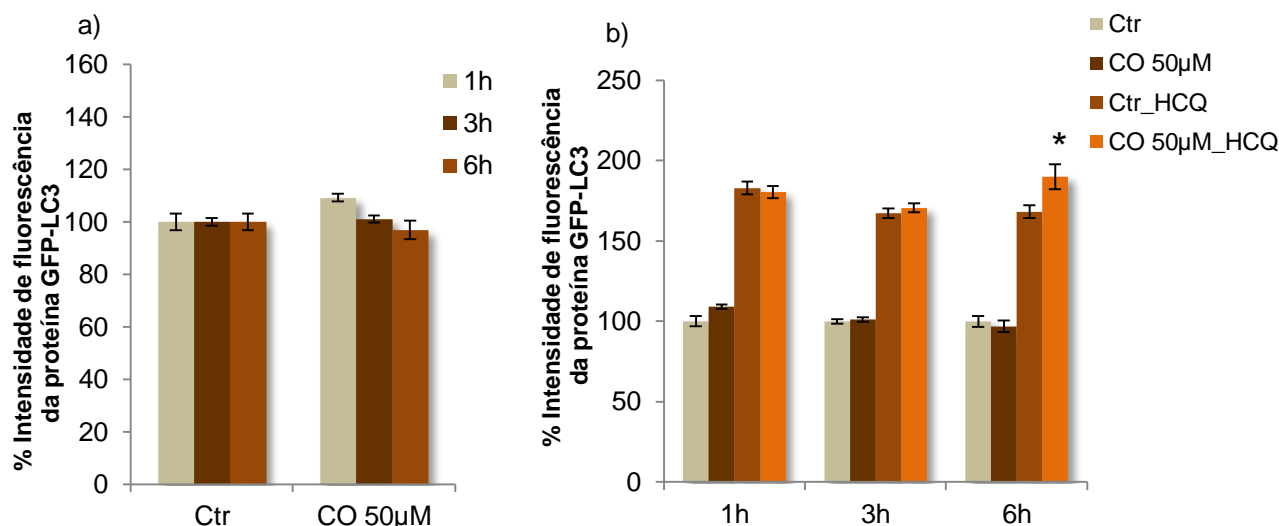


Figura 4.7. Monóxido de carbono como indutor de autofágica na linha celular HeLa GFP-LC3. a) A cinética do monóxido de carbono foi determinada por citometria de fluxo para três tempos distintos (1h, 3h e 6h). b) HCQ foi utilizada para medir o fluxo autofágico ao inibir a acção de proteases. * $p < 0.05$ comparado com o controlo com HCQ (Ctr_HCQ) respectivo. Os resultados foram obtidos a partir da média da intensidade de fluorescência média de todos os dados obtidos nas mesmas condições. Abreviaturas: Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; CO 50µM_HCQ: monóxido de carbono a 50µM com hidroxicloroquina.

Relativamente à concentração de CO a utilizar, optou-se por estudar primeiro a indução de autofagia para a concentração de 50µM, visto ser descrita como a concentração óptima para os astrócitos.

A figura 4.7 a) demonstra a cinética do monóxido de carbono como indutor de autofagia. De acordo com as diferenças de percentagem de intensidade de fluorescência obtidas, em relação aos respectivos controlos, propõe-se que a cinética de acção do CO passe por uma primeira fase de formação da proteína GFP-LC3 (após 1h), com possível formação de autofagossomas. Numa segunda fase, ou seja, ao fim de 3h começa-se a observar apenas a degradação (*quenching*) dos autofagossomas, facto que, poderá ser confirmado pelo resultado a 6h. Esta conclusão só pode ser efectivamente validada, após observação do fluxo autofágico.

Na figura 4.7 b), embora não seja representativo, é visível a cinética de indução de autofagia por parte do CO. Deste modo, para os três tempos estudados observa-se que há fluxo autofágico (CO 50µM_HCQ *versus* CO 50µM) devido há acumulação de autofagossomas. No entanto, ao fim de 1h o CO a 50µM com HCQ está ao mesmo nível do controlo com HCQ, o que significa que as células estão a sintetizar a proteína GFP-LC3 mas ainda não há formação de autofagossomas acima do nível basal. Por outro lado, ao fim de 3h, na presença de HCQ é visível um ligeiro aumento de autofagossomas, o que significa que estas estruturas começam-se a acumular acima do nível basal. Porém, é apenas após 6h, que é possível observar com clareza a acumulação destas estruturas na linha celular HeLa GFP-LC3 (rapamicina_HCQ *versus* Ctr_HCQ).

Com base nestes resultados preliminares conclui-se que o CO na concentração de 50 μ M apresenta um efeito muito subtil, pois as diferenças observadas entre condições são muito pequenas. Para além disso, esta molécula demora 6h a induzir e a finalizar o processo autofágico em células HeLa GFP-LC3.

O CO apresenta uma cinética parecida com a da rapamicina, ou seja, inicialmente é visível um aumento da proteína GFP-LC3, que participa na formação de autofagossomas, seguido da degradação destas estruturas, via lisossoma. Contudo, apresenta um efeito muito mais subtil que a rapamicina, pois os níveis de indução de autofagia são menores entre as várias condições (1h, 3h e 6h) de CO a 50 μ M e entre estas e os respectivos controlos (Ctr). No entanto, poderá ser mais rápido, pois para 3h de CO a 50 μ M há evidências, de que este apresente uma velocidade de indução de degradação de autofagossomas superior à de 3h de rapamicina (figura 4.2 a)). Comparando o CO com a condição de privação de nutrientes (meio EBBS) conclui-se que tem uma rapidez de actuação inferior ao meio EBBS, que actua em menos de 1h. Deste modo, pode-se concluir que o CO a 50 μ M induz de forma ligeira a autofagia e apresenta uma rapidez de actuação inferior ao meio EBBS, mas superior à rapamicina. Na tabela 8.6, no anexo I, encontram-se os valores utilizados nesta figura.

Para um melhor entendimento da cinética deste gás será necessário aumentar o número de experiências.

A figura 4.8 exemplifica os resultados obtidos por CF para a figura 4.7. Apenas é visível o aumento da intensidade de fluorescência (deslocamento para a direita) do CO, ao fim de 3h, quando as células estão na presença de HCQ. Devido ao pouco número de eventos (5000), não é possível apresentar figuras com uma curva gaussiana.

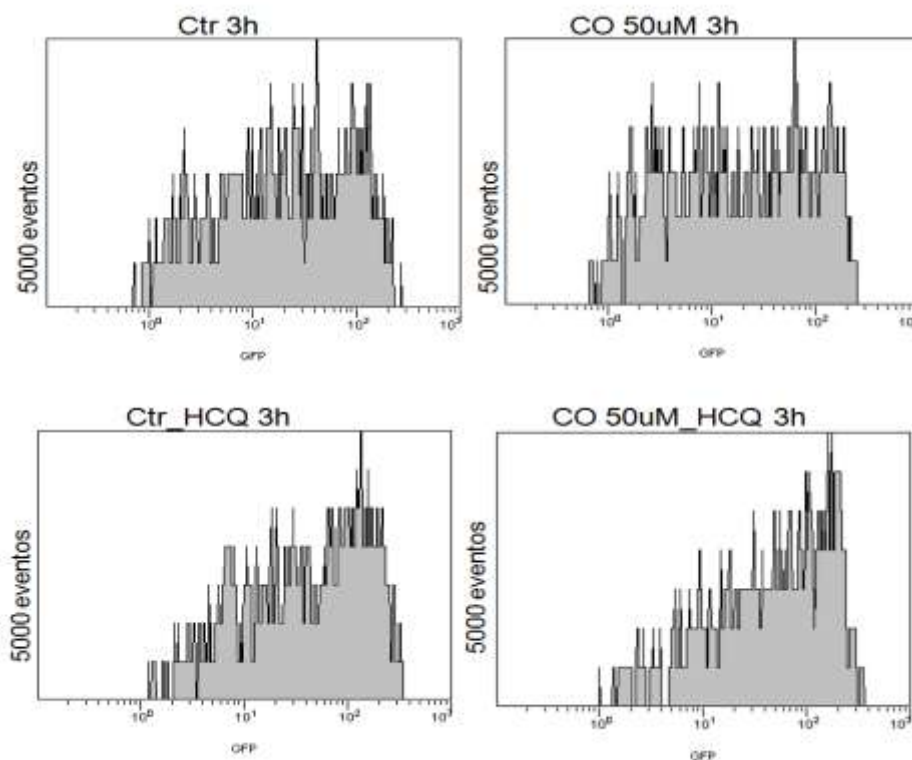


Figura 4.8. Imagem de gráficos de citometria de fluxo de monóxido de carbono como indutor de autofagia em células HeLa GFP-LC3. Gráficos de 3h mostrando diferenças muito subtis entre o CO e o controlo. A HCQ foi utilizada para bloquear proteases lisossomais de modo a poder-se medir o fluxo autofágico. Abreviaturas: CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; CO 50µM_HCQ: monóxido de carbono a 50µM com hidroxicloroquina.

4.1.2. Estudo dos níveis proteicos após indução de autofagia

Outra técnica utilizada para determinar se o CO activa a autofagia foi o *western blot* (WB). O efeito do CO foi testado para duas concentrações, 50µM e 100µM. Foram também testados tempos curtos (3h), bem como tempos longos (24h) onde foi seguida a expressão de determinadas proteínas que participam em diferentes fases do processo autofágico, tais como, a p62, p-S6 e LC3I/II. As proteínas actina e a GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foram utilizadas como controlos de carga internos.

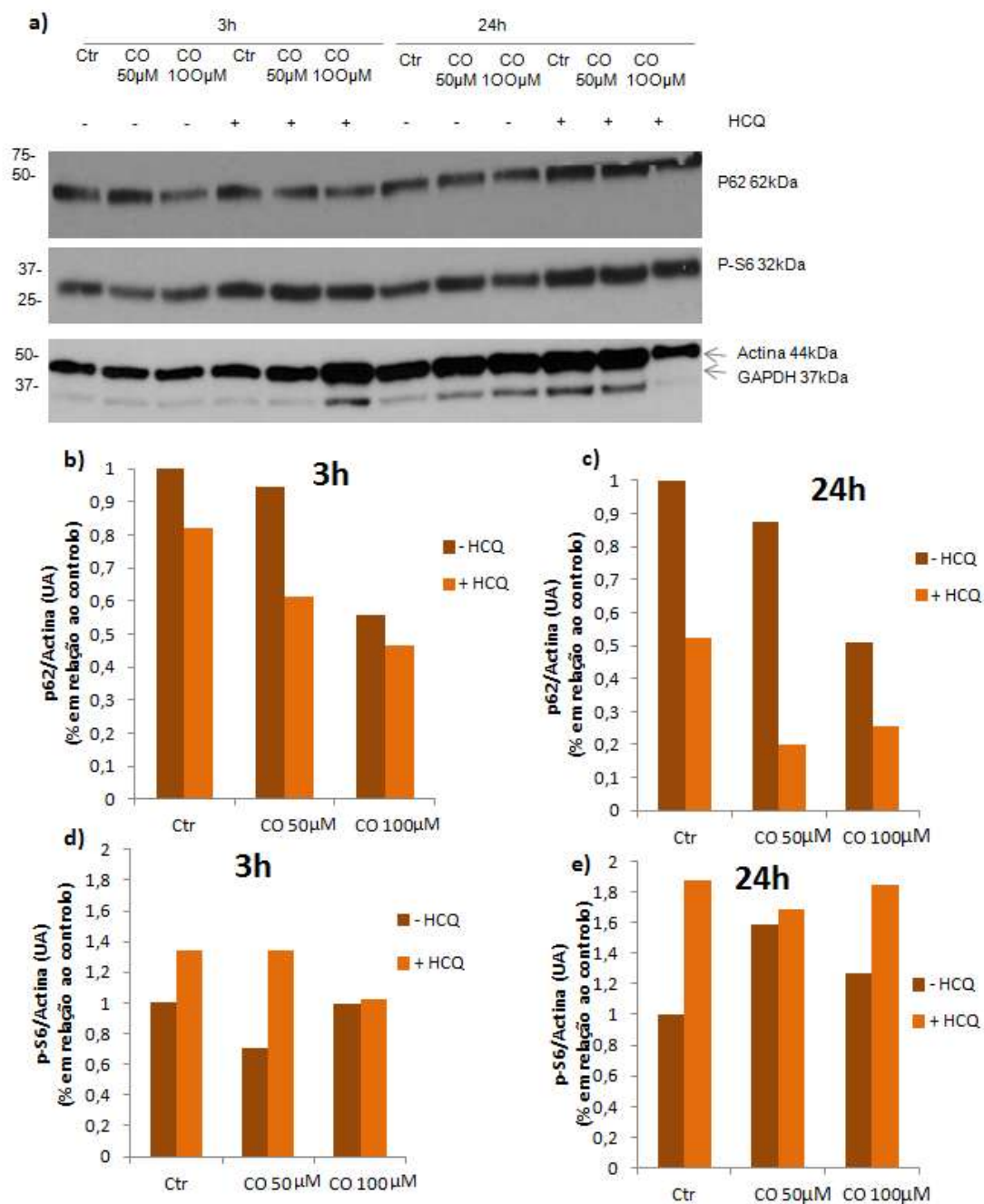


Figura 4.9. Monóxido de carbono induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3 – expressão da p62 e p-S6. A linha celular foi exposta a CO e o seu efeito foi analisado 3h e 24h após tratamento, para a expressão da p62, p-S6, actina e GAPDH, por *western blot*. Actina e GAPDH foram usadas como controlos de carga interno. A HCQ foi utilizada para bloquear proteases lisossomais com intuito de observar-se o fluxo autofágico. A quantificação da p62 e p-S6 foi realizada através da quantificação de bandas pelo programa *ImageJ*, e normalizada em relação à actina, figura 20 b) e c) e figura 20 d) e e), respectivamente. A massa molecular está expressa em kDa. Abreviaturas: UA: unidade arbitrária; Ctr: controlo; CO 50μM: monóxido de carbono a 50μM; CO 100μM: monóxido de carbono a 100μM; HCQ: hidroxycicloroquina; - HCQ: sem hidroxycicloroquina; + HCQ: com hidroxycicloroquina; p-S6: proteína ribossomal p-S6; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

A p62 ou SQSTM1 está directamente envolvida na formação do autofagossoma ao ligar-se à proteína LC3II e proporcionar que agregados de proteínas, ou proteínas e organelos disfuncionais

sejam degradados via autofagia. No entanto, esta proteína participa também noutra via de degradação, o proteossoma. De acordo com evidências descritas na Literatura, é expectável que os níveis de p62 diminuam com a activação da autofagia e que, quando esta última se encontre bloqueada os seus níveis aumentem [70].

As bandas apresentadas na figura 4.9 foram todas normalizadas com respeito à actina. Assim, de acordo com a figura 4.9 a), b) e c), é visível que para 3h e 24h na ausência de HCQ, os níveis da proteína p62 diminuem ligeiramente para células expostas a CO a 50µM e consideravelmente para células expostas a CO a 100µM, o que indica que o CO está a induzir a autofagia. Por outro lado, ao se observar as mesmas bandas na presença de HCQ verifica-se que a sua intensidade é menor em relação ao seu controlo (Ctr_HCQ) e em relação à condição sem HCQ. Apesar de a p62 transportar proteínas e organelos para o autofagossoma e apenas transportar proteínas para o proteossoma, uma vez que a autofagia esteja inibida, a eliminação de proteínas é realizada exclusivamente pelo proteossoma, o que aumenta a p62 existente na célula. Este facto faz com que este resultado não se encontre de acordo com o esperado, pois seria expectável que houvesse acumulação da p62 a 3h e 24h, para ambas as concentrações de CO na presença de HCQ. Uma explicação possível para esta diminuição, poderá ser devido a algum artefacto técnico, uma vez que esta experiência foi apenas realizada uma vez.

De acordo com estes resultados, a 3h horas o CO induz a autofagia para as duas concentrações estudadas, mas a níveis mais baixos do que a 24h. É de se referir que, de acordo com estes resultados, a melhor concentração de CO será a de 100µM. Para confirmar esta suposição o comportamento de outras proteínas foi observado, nomeadamente o da p-S6.

A proteína cinase ribossomal (p-S6), que participa na cascata de sinalização de síntese proteica, é normalmente utilizada para verificar a actividade de mTOR, pois quando este está activo (autofagia inibida) activa a cinase S6, que por sua vez fosforila o seu substrato ribossomal, o que resulta num aumento da p-S6 [71]. Como tal, com a indução da autofagia é esperada uma diminuição dos níveis desta proteína, ao passo que, quando a autofagia se encontra bloqueada (como por exemplo com HCQ) é difícil delinear uma conclusão porque a p-S6 não participa na formação de autofagossomas. Assim, o bloqueio de fluxo não indica que tenha que haver acumulação desta proteína. De facto, evidências na Literatura demonstraram que a p-S6 pode autorregular-se e activar a sua fosforilação após determinado tempo de inibição, o que volta a aumentar os seus níveis na célula [72].

Após 3h (figura 4.9 a) e d)), verifica-se que para CO a 50µM, na ausência de HCQ, existe efectivamente uma diminuição desta proteína em relação ao controlo, indicando que a autofagia está a ser induzida, por outro lado, para CO a 100µM, o mesmo não acontece, o que pode indicar que a esta concentração, a autofagia possa estar a ser inibida. Este resultado não está de acordo com o obtido para a p62, para as mesmas condições, o que sugere outra hipótese, a de que a p-S6 possa

estar a autorregular-se negativamente. Isto é, 100 μ M de CO pode ser um estímulo muito forte, de tal modo que, a quantidade desta proteína baixa rapidamente para concentrações que não são compatíveis com a fisiologia normal da célula. Tal evento desencadeia mecanismos de regulação negativa que voltam a activar mTOR, aumentando de seguida os níveis desta proteína [72]. Analisando as intensidades das bandas na presença de HCQ para 3h, figura 4.9 d), observa-se que para CO a 50 μ M, não há alteração dos níveis da p-S6 quando comparado com o respectivo controlo (Ctr_HCQ). Como esta proteína não participa na formação de autofagossomas, este resultado encontra-se de acordo com o esperado [73]. O aumento observado entre CO 50 μ M_HCQ e CO 50 μ M, bem como entre Ctr_HCQ e Ctr, pode dever-se à necessidade por parte da célula de sintetizar novas proteínas e como tal, os seus níveis aumentam. Por outro lado, para CO a 100 μ M, os seus níveis mantêm-se semelhantes aos obtidos na ausência de HCQ, o que remonta para as duas hipóteses mencionadas anteriormente (inibição da autofagia ou regulação negativa).

Para 24h, figura 4.9 a) e e), o comportamento desta proteína é totalmente o oposto do previsto. O aumento dos seus níveis para os tratamentos de monóxido de carbono em relação ao controlo na ausência de HCQ, conduz-nos uma vez mais, à hipótese de que esta proteína poderá estar a ser regulada negativamente. Por outro lado, na presença de HCQ, há um aumento da p-S6, em relação aos tratamentos na ausência deste inibidor de fluxo, o que pode dever-se ao facto, de ser necessário para as células sintetizarem novas proteínas.

Em conclusão, a análise da p62 indica que o CO a 50 μ M induz autofagia e que a quantificação da proteína p-S6 não é uma estratégia eficiente para se analisar a indução do processo autofágico através do fluxo.

Para corroborar este resultado, procedeu-se à análise de outras proteínas, de modo a tirar conclusões mais claras acerca do fluxo autofágico. Assim, os níveis celulares das proteínas LC3I/II foram estudados por *western blot*.

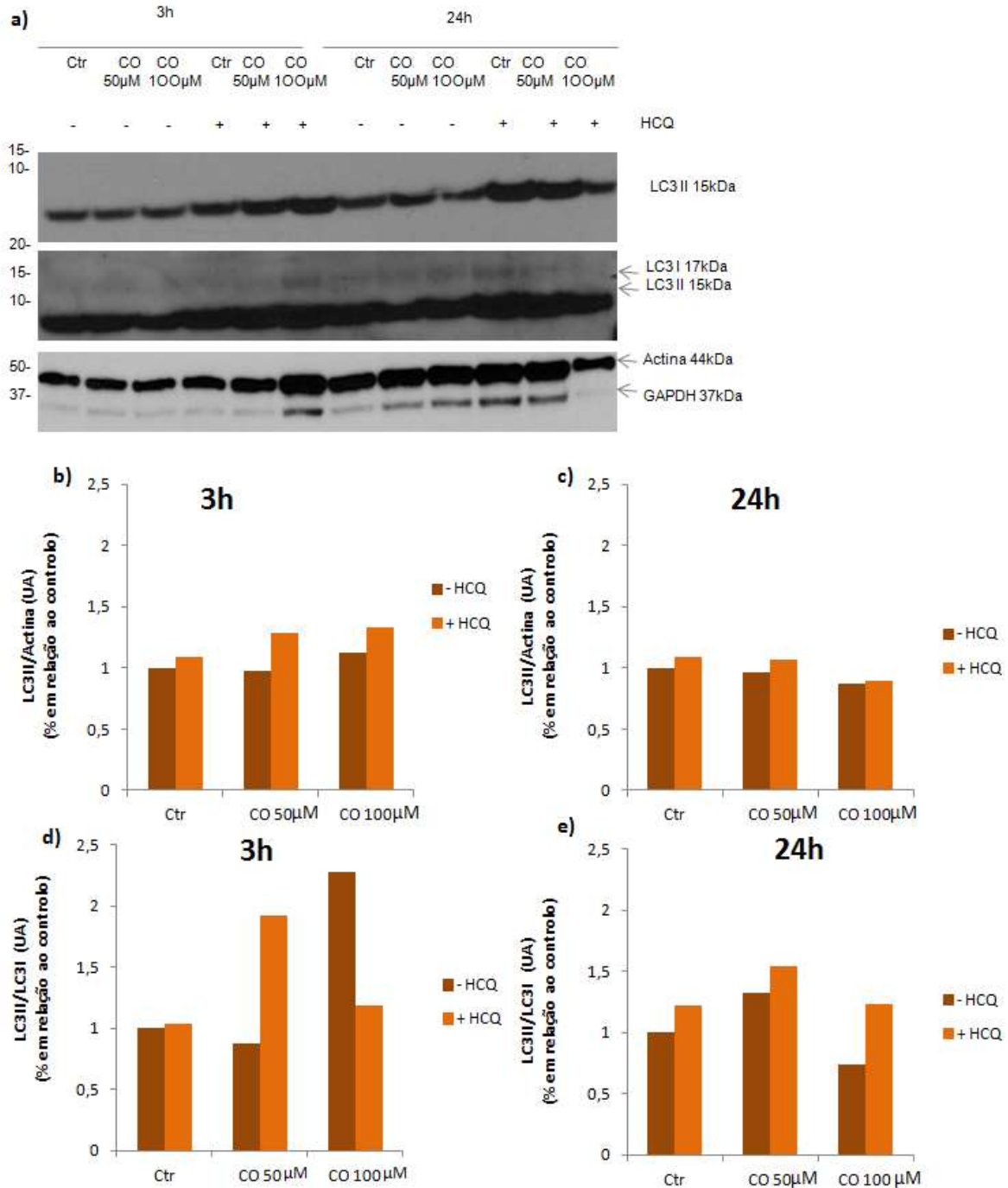


Figura 4.10. Monóxido de carbono induz autofagia na linha celular HeLa GFP-LC3 – expressão da LC3I e LC3II. A linha celular foi exposta a CO e o seu efeito foi analisado 3h e 24h após tratamento, para a expressão da LC3I/II, actina e GAPDH, por *western blot*. Actina e GAPDH foram usadas como controles de carga interno. A HCQ foi utilizada para bloquear proteases lisossomais com intuito de observar-se o fluxo autofágico. A quantificação da LC3I/II foi realizada através da quantificação de bandas pelo programa *ImageJ*, e normalizada em relação à actina. A massa molecular está expressa em kDa. Abreviaturas: UA: unidade arbitrária; Ctrl: controle; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; CO 100µM: monóxido de carbono a 100µM; HCQ: hidroxicloroquina; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Apesar do peso molecular da LC3II (forma conjugada com PE) ser superior ao da LC3I, 16kDa e 14kDa, respectivamente, devido à sua extrema hidrofobicidade a LC3II migra mais rapidamente que a LC3I [66], o que pode ser facilmente comprovado pela figura 4.10 a).

De acordo com a Literatura, há duas formas de verificar se a autofagia está a ser induzida. Através da observação da quantidade de LC3II entre amostras, ou seja, caso haja aumento da LC3II em relação aos controlos, na presença de inibidores do fluxo, significa que há aumento da actividade autofágica [74]. O outro método consiste na análise do rácio entre LC3II/LC3I [74], pois a conversão da LC3I para LC3II não deve ser observada por uma simples comparação entre as intensidades das bandas, uma vez que, a LC3II tende a ser mais sensível de detectar por *western blot* do que a LC3I, o que pode falsear os resultados.

Assim, de acordo com estas especificações encontradas na Literatura, verifica-se que para 3h de actuação de CO na presença de HCQ há fluxo autofágico e a autofagia está a ser induzida acima do nível basal celular, para ambas as concentrações de CO testadas (figura 4.10 b)). Esta conclusão surgiu a partir da comparação dos resultados para CO a 50 μ M e CO a 100 μ M, na presença de HCQ com os respectivos controlos (Ctr_HCQ), bem como em relação às mesmas bandas na ausência de HCQ, respectivamente. De entre as duas concentrações de CO testadas para 3h, a que apresentou melhores resultados foi a concentração de 100 μ M, pois a acumulação de autofagossomas foi maior (diferença entre as bandas de CO_HCQ e controlo_HCQ). Por outro lado, a 24h na presença de HCQ, verifica-se que os níveis da LC3II não são superiores ao do controlo (Ctr_HCQ) para CO a 50 μ M, o que permite concluir que 24h após a adição de CO, este já não induz a autofagia. A CO a 100 μ M é visível que não há fluxo autofágico nem acumulação de autofagossomas acima no nível basal, o que pode ser indicativo de que a esta concentração os autofagossomas já foram todos degradados e como tal, a HCQ não conseguiu inibir a autofagia.

Através do rácio entre a LC3II e LC3I, é possível também verificar se a autofagia está a ser activada acima do nível basal, na presença de monóxido de carbono. Ao observar a figura 4.10 d) e e) comprova-se a existência de fluxo apenas para CO a 50 μ M, para 3h e 24h, embora ao fim de 3h o fluxo seja maior. Para CO a 100 μ M, ao fim de 3h na presença de HCQ há menos LC3II do que na ausência de HCQ e para 24h a intensidade da banda de CO a 100 μ M com HCQ está igual ao respectivo controlo (Ctr_HCQ), o que demonstra que a esta concentração, o CO parece não induzir a autofagia para os dois tempos testados. Esta hipótese invalida a proposta anterior, onde foi referido que a HCQ não foi eficiente na inibição da autofagia.

Esta segunda análise (rácio LC3II/I) apresenta conclusões semelhantes à primeira para a concentração de 50 μ M. No entanto, para 100 μ M, as conclusões de ambas as análises são diferentes, o que pode dever-se a artefactos técnicos, uma vez que, as bandas referentes à proteína LC3I encontram-se muito ténues. Deste modo, apenas serão tidos em consideração os resultados obtidos pela primeira análise.

Os resultados obtidos para 3h estão de acordo com os obtidos por CF, pois em ambos foi visível um aumento dos níveis da proteína LC3II e GFP-LC3II nas células, indicativo de que a autofagia foi activada acima do nível basal.

Assim, com base nos resultados para ambas as figuras, conclui-se que apesar das duas concentrações de CO induzem a autofagia, a concentração de 50µM aparenta ser a mais eficiente. Relativamente aos tempos utilizados, este agente induz a autofagia a tempos de actuação curtos (3h). Na tabela 8.7 do anexo I, encontram-se os valores obtidos após análise e tratamento de dados pelo programa *ImageJ*.

4.1.3. Estudo quantitativo de indução de autofagia

Por microscopia de fluorescência é possível observar a formação de autofagossomas, através da contagem de *spots* fluorescentes devido à proteína GFP-LC3. Por esta técnica foi apenas testada a concentração de CO a 50µM. Foi também avaliado o comportamento do controlo positivo, condição meio EBSS a tempos curtos (1h, 3h e 6h). Através do *software* utilizado pela empresa Wimassis foi possível distinguir autofagossomas de agregados de LC3 existentes no citoplasma.

4.1.3.1. Teste de indução de autofagia para o meio *Earle's Balanced Salt Solution*

À semelhança do estudo efectuado por citometria de fluxo para os controlos positivos, também por microscopia de fluorescência se recorreu à condição de privação de nutrientes, com o objectivo de comparar a sua cinética com a cinética do monóxido de carbono CO.

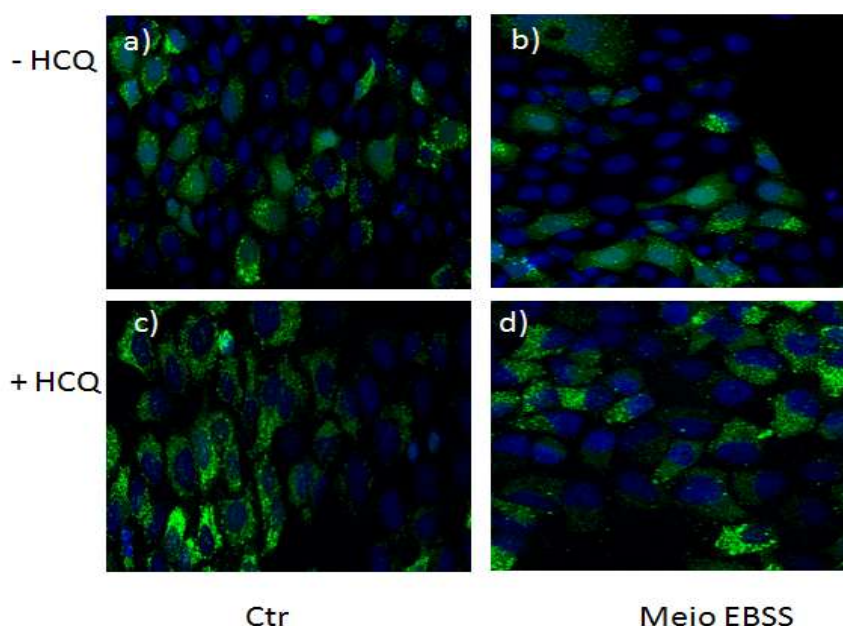
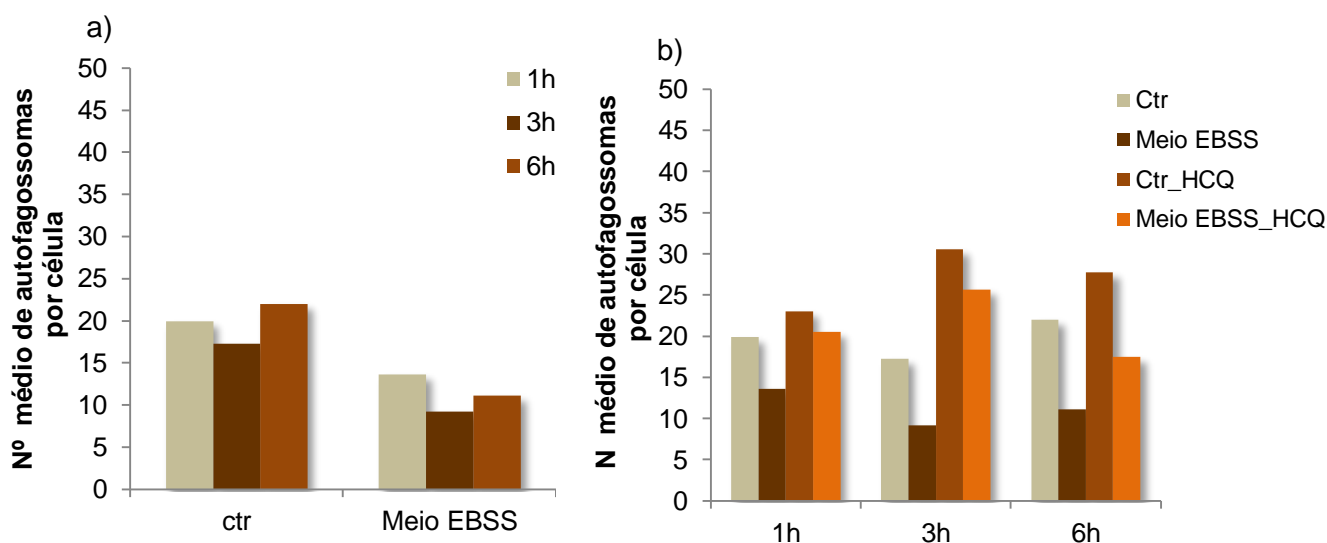


Figura 4.11. Imagens representativas do Meio EBSS como indutor de autofagia. As células foram colocadas em 500µL de meio EBSS e fixas em lamelas com PFA e analisadas por microscopia de fluorescência. a), b), c), d) Imagens de microscopia de fluorescência para um tempo de exposição de 3h, onde o núcleo está identificado a azul pelo fluorocromo DAPI e os autofagossomas identificados a verde pela fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3 (número de fotos por condição:6). A HCQ foi utilizada para inibir a acção de proteases de modo a observar-se o fluxo autofágico. Abreviaturas: PFA: Paraformaldeído; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole; Ctr: controlo; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina.

Na figura 4.11 encontra-se um exemplo de fotografias tiradas para 3h após a adição do meio EBSS. É visível um aumento de fluorescência em quantidade e em intensidade ao comparar-se as imagens na ausência de HCQ, com as respectivas imagens na presença de HCQ. Porém, é de salientar que na ausência e na presença do inibidor de fluxo, HCQ, a intensidade e quantidade da proteína GFP-LC3 por célula, é menor na condição meio EBSS quando comparado com os respectivos controlos. Este facto indica que o meio EBSS actua de forma muito rápida. Apesar de ver-se diferenças entre as fotografias foi necessário quantificar o número autofagossomas por célula, de modo a garantir maior segurança em relação aos resultados obtidos.

Na figura 4.12 encontra-se a representação gráfica do número médio de autofagossomas por célula, para tempos curtos (1h, 3h e 6h). Os valores podem ser consultados na tabela 8.8, anexo I.



Figuras 4.12. Meio EBSS induz autofagia em linha celular HeLa GFP-LC3. a) A cinética do controlo positivo foi testado para 1h, 3h, e 6h de privação de nutrientes (número de fotos por condição:6). b) A HCQ foi utilizada para inibir a acção de proteases lisossomais com o objectivo de se medir o fluxo autofágico. O número medio de autofagossomas por célula foi contado por um *software* específico, realizado pela empresa Wimassis, baseado na fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3 e pelo fluorocromo DAPI. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxicloroquina.

De acordo com a figura 4.12 a), o meio EBSS apresenta uma diminuição do número médio de autofagossomas por célula, em relação ao respectivo controlo ao longo dos três tempos estudados, o que indica que, o meio EBSS actua muito rápido. A figura 4.12 b) permite concluir que há fluxo autofágico (Meio EBSS_HCQ *versus* Meio EBSS), mas atendendo à rápida actuação do meio EBSS e ao facto da HCQ demorar 3h a inibir por completo a autofagia, não é observável um aumento no número médio de autofagossomas (Meio EBSS_HCQ *versus* Ctr_HCQ). Provavelmente observar-se-ia um aumento a tempos mais curtos (a 15min ou 30 min). A cinética do meio EBSS por microscopia de fluorescência é semelhante à obtida por citometria de fluxo, ou seja, apenas é visível a degradação de autofagossomas.

4.1.3.2. Teste de indução com monóxido de carbono

Após monitorização da cinética do controlo, foi realizado o mesmo estudo para o CO.

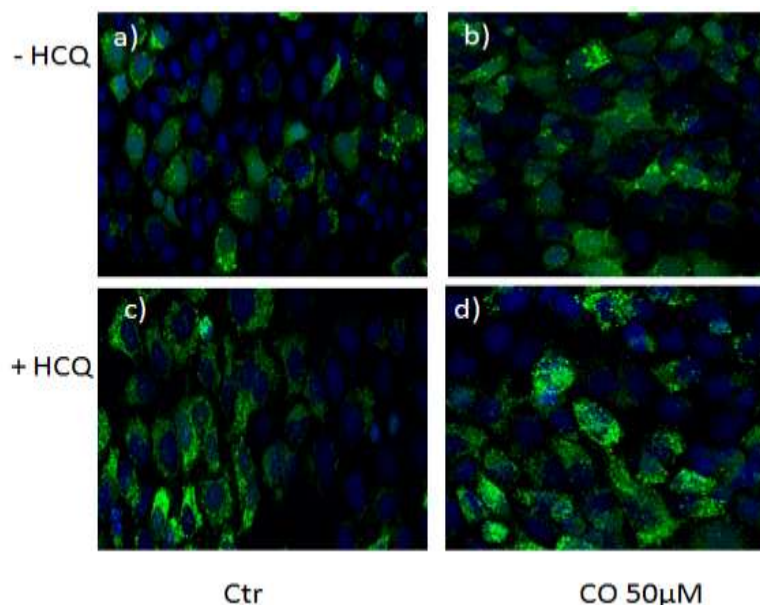


Figura 4.13. Fotografias representativas do monóxido de carbono como indutor de autofagia. As células foram fixas em lamelas com PFA e analisadas por microscopia de fluorescência. a), b), c), d) Imagens de microscopia de fluorescência para um tempo de exposição de 3h, onde o núcleo está identificado a azul pelo fluorocromo DAPI e os autofagossomas identificados a verde pela fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3. A HCQ foi utilizada para inibir a acção de proteases de modo a observar-se o fluxo autofágico. Abreviaturas: PFA: paraformaldeído; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50 µM; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina.

Na figura 4.13 é visível o efeito do CO como indutor da autofagia a 3h, pois há um aumento evidente do número médio de autofagossomas por célula, na condição sem e com HCQ em relação aos respectivos controlos. É possível verificar também que, com este inibidor há um aumento da fluorescência verde em quantidade e intensidade. À semelhança do meio EBSS, foram quantificadas em todas as fotografias a intensidade de fluorescência e o número médio de autofagossomas por célula calculado.

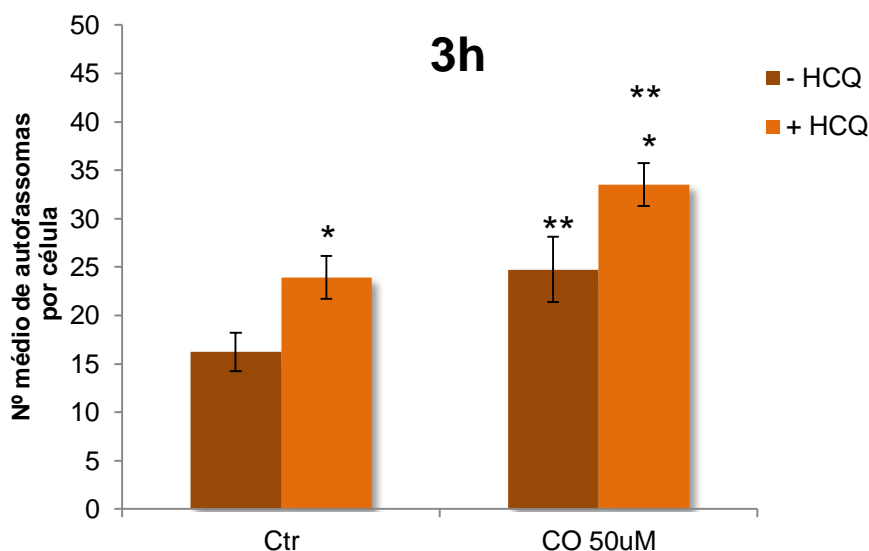


Figura 4.14. Monóxido de carbono como indutor de autofagia em células HeLa GFP-LC3. O CO foi testado para um tempo de actuação de 3h. O número medio de autofagossomas por célula foi contado por um *software* específico realizado pela empresa Wimassis, baseado na fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3 e pelo fluorocromo DAPI. A HCQ foi utilizada para bloquear a acção de proteases lisossomais de modo a se poder tirar elações sobre o fluxo autofágico. (número de fotografias por condição=12). * $p < 0.05$ comparando com o respectivo controlo; ** $p < 0.05$ comparando com a respectiva condição na ausência de HCQ. Abreviaturas: PFA: paraformaldeído; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole; Ctr: controlo; CO 50 μ M: monóxido de carbono a 50 μ M; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina.

Na figura 4.14 é possível observar que para CO a 50 μ M na ausência de HCQ, o número médio de autofagossomas por célula é superior ao controlo, o que leva a questionar, se o aumento observado é devido a um aumento do número médio de autofagossomas ou devido a uma inibição do fluxo. Assim, é necessário a utilização de um inibidor de fluxo (HCQ) de modo a esclarecer este resultado. Na presença de HCQ observa-se que há fluxo autofágico e acumulação de autofagossomas ao fim de 3h. Este resultado indica que o monóxido de carbono induz a autofagia acima do nível basal, contudo, ao comparar-se com a cinética obtida por privação de aminoácidos (meio EBSS) verifica-se que a cinética do CO é mais lenta que a do controlo. Os valores referentes à figura 4.14 podem ser consultados na tabela 8.9 no anexo I.

Com a utilização das três técnicas foi possível obter resultados (preliminares), que indicam que há uma ligeira indução de autofagia nas células HeLa GFP-LC3 pelo CO a 50 μ M, que terá o seu pico de indução entre 1h e 3h após exposição. Isto deve-se a um aumento da intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 ao fim de 1h (observado por CF), proteína essa que foi lipídada a LC3II e utilizada na formação de autofagossomas, facto que pode ser comprovado a 3h pelo aumento dos níveis dessa proteína (observado por WB e MF). Por último, a 6h foi visível a fase final deste processo, que culminou com o *quenching* desta proteína (observado por CF). Deste modo, a cinética de actuação do CO é mais lenta que a da condição meio EBSS e mais rápida que a rapamicina, no entanto, apresenta um efeito muito subtil em relação aos dois indutores testados.

4.2. Estudo do efeito do monóxido de carbono como indutor de autofagia em astrócitos

Para determinar se o CO induz a autofagia em astrócitos recorreu-se à técnica de WB, uma vez que, permite retirar informação analítica e quantitativa. Para este tipo celular apresentam-se apenas resultados referentes às proteínas LC3I/II, como meio de verificar se o CO induz a autofagia, através da monitorização do fluxo autofágico. A privação de aminoácidos e nutrientes (meio EBSS) foi usada como controlo positivo.

4.2.1. Estudo do fluxo autofágico

A concentração de CO utilizada foi de 50 μ M e a nível de tempos de actuação testou-se 3h e 6h, pois já tinha sido demonstrado em trabalhos desenvolvidos no laboratório, que 50 μ M é a concentração óptima usada para citoprotecção em astrócitos e que 3h é o tempo o mínimo para que o CO possa ser citoprotector [58].

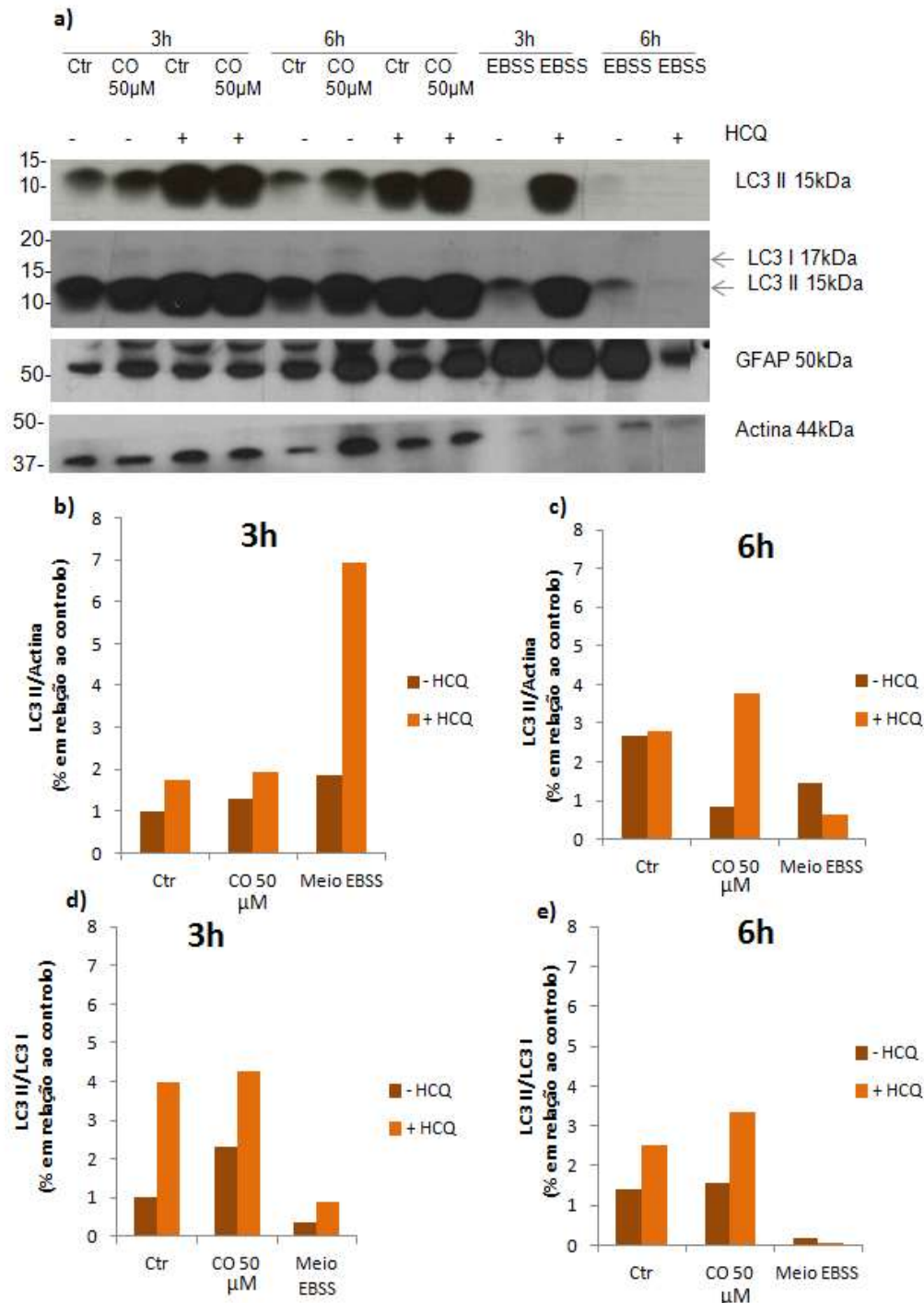


Figura 4.15. Monóxido de carbono induz autofagia em astrócitos – expressão da LC3I e LC3II. Os astrócitos foram expostos a CO e o seu efeito analisado após 3h e 6h para a expressão da LC3I/II, GFAP e actina por *western blot*. Actina foi utilizada com controlo de carga interno. O meio *Early Balanced Salt Solution* (EBSS) foi utilizado como controlo positivo ao privar as células de aminoácidos. A HCQ foi utilizada em ambas as experiências como bloqueador de proteases lisossomais para se poder concluir acerca do fluxo autofágico. A quantificação da LC3I/II foi realizada através da quantificação de bandas pelo programa *ImageJ*, e normalizada em relação à actina. A massa molecular está expressa em kDa. Abreviaturas: UA: unidade arbitrária; Ctrl: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; HCQ: hidroxicloroquina; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina; GFAP: proteína glial fibrilar ácida.

De acordo com a figura 4.15 a), b) e c) para a concentração de CO testada (50µM), após 3h e 6h, pode-se concluir que o CO activa a autofagia, pois há fluxo autofágico e acumulação de

autofagossomas (CO 50 μ M_HCQ *versus* Ctr_HCQ e CO 50 μ M_HCQ *versus* CO 50 μ M, respectivamente). No entanto, a 6h a indução é maior que a 3h, pois a acumulação de autofagossomas na presença de HCQ, entre o CO e o controlo é maior.

Quando comparado o rácio entre a LC3II e LC3I (figura 4.15 d) e e)), verifica-se que também há fluxo autofágico e que o CO induz a autofagia melhor a 6h, devido à acumulação de autofagossomas ser maior, o que corrobora os resultados anteriores.

Relativamente ao controlo positivo testado, condição meio EBSS, verifica-se que para 3h, figura 4.15 a), há uma grande indução da autofagia, através da presença de fluxo autofágico. A diferença entre a intensidade do meio EBSS na presença de HCQ e o seu controlo (meio EBSS_HCQ *versus* meio EBSS) para 3h não está de acordo com o esperado, pois de acordo com o observado para a linha celular HeLa GFP-LC3 por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, na presença de HCQ é visível apenas a degradação dos autofagossomas. No entanto, por WB está-se a medir um parâmetro diferente (quantidade de LC3II nas células) dos medidos por CF e MF. Deste modo, o resultado obtido pode ser devido ao facto de, estar-se a contabilizar toda a proteína LC3II, ou seja, a que participa na formação do autofagossoma e aquela que está a ser gerada independentemente do processo autofágico (ectópica) [66]. Esta explicação apesar de válida, não justifica tamanha diferença observada, que pode ser devido ao facto de, estar-se a trabalhar com um tipo celular diferente da linha HeLa GFP-LC3 e como tal, ter uma reacção diferente aos indutores em estudo. Provavelmente, em astrócitos o tempo de formação de autofagossomas é superior ao tempo de degradação destas estruturas por fusão com lisossomas, na presença deste indutor. Para um melhor entendimento deste resultado, será necessário estudar a cinética desta condição (meio EBSS) ao longo do tempo por exemplo por citometria de fluxo.

Para 6h após adição do meio EBSS na presença de HCQ não há fluxo autofágico (figura 4.15 a) e c)). Tal facto deve-se provavelmente, uma vez mais à forte e rápida actuação deste agente. Tal resultado, contraria a explicação encontrada para 3h, que efectivamente pode dever-se a algum artefacto técnico (confluência do poço ou ao processo de extracção). No entanto, novos estudos da cinética do meio EBSS serão necessários. Por outro lado, os resultados obtidos após o rácio encontram-se de acordo com o esperado, ou seja, não há acumulação de autofagossomas, uma vez que estas estruturas foram degradadas, antes que a HCQ pudesse inibir este passo. Os valores obtidos podem ser consultados na tabela 8.10 no anexo I.

Tendo em consideração ambas as análises e os resultados obtidos em relação à linha celular HeLa GFP-LC3 para o meio EBSS, seria esperado obter-se resultados similares aos obtidos através do rácio da LC3II/I. No entanto, novas experiências são necessárias para aumentar o número de resultados, de modo a corroborar esta hipótese, além de ser necessário realizar um estudo cinético do CO em astrócitos acompanhado de controlos, como realizado na linha celular HeLa GFP-LC3.

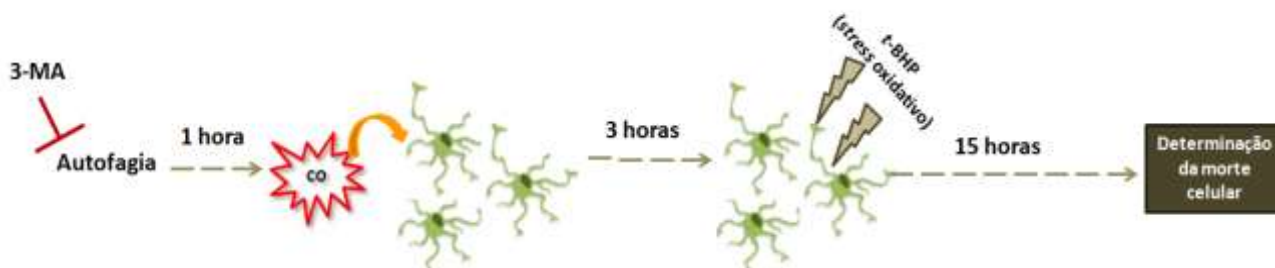
A proteína GFAP foi utilizada como marcador de que a cultura celular encontrava-se rica em astrócitos, relativamente a outros tipos celulares, razão pela qual, não foi demonstrada a sua normalização.

4.3. Estudo da importância da autofagia no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos

Atendendo ao facto do CO agir por PC e ter efeitos de sinalização pequenos (pouca produção de ROS ou pouca indução de autofagia), a prova mais importante será a funcional, ou seja, verificar se a indução de autofagia pelo CO é fundamental para a citoprotecção promovida por este gás.

Para estudar o papel da autofagia na protecção conferida pelo CO realizaram-se experiências de citometria de fluxo, para se medir a viabilidade celular. A morte celular dos astrócitos foi induzida por *stress* oxidativo (adição de *t*-BHP), onde a autofagia foi inibida química (3-MA) ou geneticamente (ATG5^{-/-}). Assim, após pré-condicionamento de 3h com CO, as células são tratadas com *t*-BHP e a sua viabilidade estudada através do fluorocromo PI (esquema 4.1). Desta forma, foi possível verificar o papel da autofagia na citoprotecção induzida pelo CO.

4.3.1. Estudo do papel da autofagia por inibição química



Esquema 4.1. Hipótese do mecanismo de protecção proposto – inibição química. Através da inibição da autofagia por 3-MA, pretende-se observar um decréscimo na viabilidade celular, após astrócitos pré-condicionados com CO serem expostos *stress* oxidativo (*t*-BHP), de acordo com o intervalo temporal de adição estabelecido.

Seguindo o esquema 4.1 foram então realizadas experiências de citometria de fluxo para se analisar a viabilidade dos astrócitos.

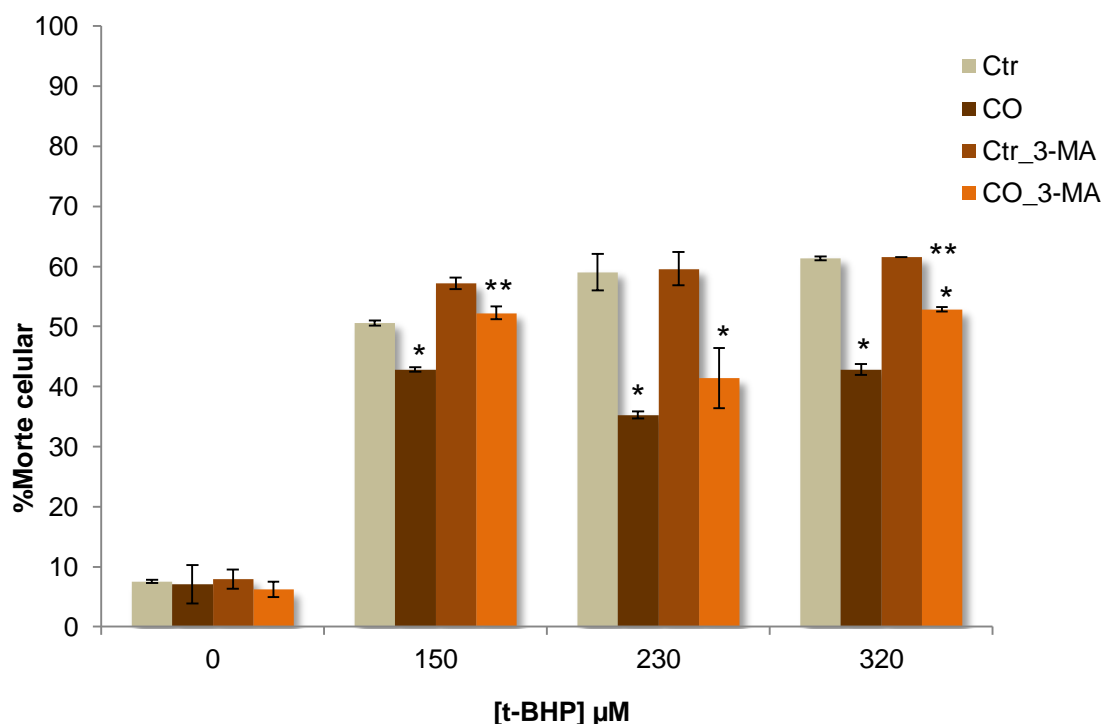


Figura 4.16. Autofagia: um mecanismo importante no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos – determinação por inibição química. A figura representa a percentagem de morte celular após células pré-condicionadas com CO a 50µM terem sido expostas a diferentes concentrações de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP). 3-MA foi adicionado para inibir a autofagia com o objectivo de se avaliar a sua importância. As concentrações de *t*-BHP foram escolhidas após observação da incidência de morte.* $p < 0.05$ comparando com os respectivos controlos (Ctr); ** $p < 0.05$ comparando com as respectivas condições de CO. Abreviaturas: Ctr: Controlo; Ctr_3-MA: controlo com 3-metiladenina; CO_3-MA: monóxido de carbono com 3-metiladenina.

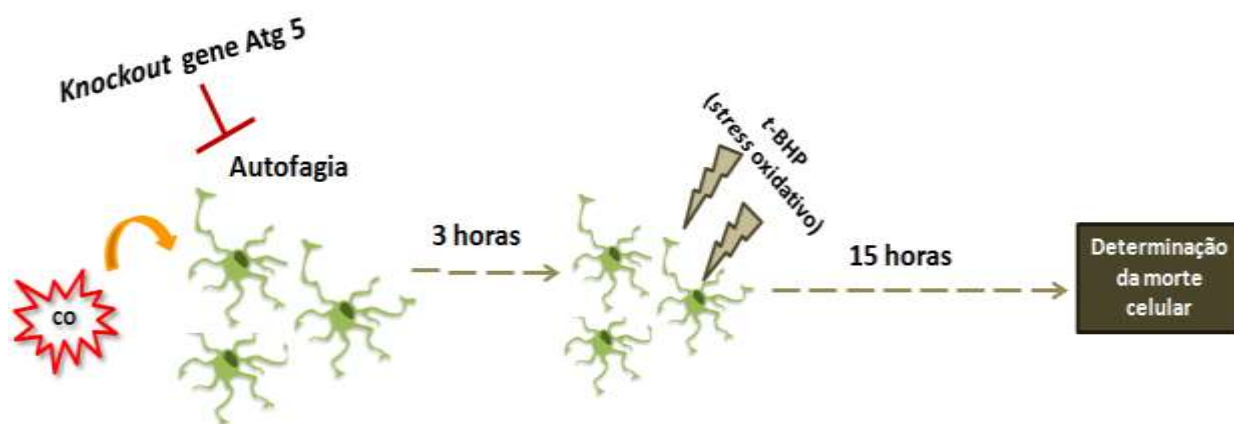
Os astrócitos pré-condicionados com CO apresentam uma percentagem de morte inferior aos seus respectivos controlos (Ctr), para as três concentrações de *t*-BHP testadas, enquanto, astrócitos pré-condicionados com CO e com autofagia bloqueada (CO_3-MA) apresentam uma maior percentagem de morte, em relação a astrócitos pré-condicionados com CO (concentração de 150µM e 320µM). Com base nestes resultados, pode-se concluir que a autofagia está envolvida no processo de citoprotecção pelo qual o CO actua.

Um resultado interessante, foi o conjunto de percentagens de morte celular que se obtiveram para astrócitos pré-condicionados com CO e com a autofagia inibida (CO_3-MA) em comparação com os seus respectivos controlos (Ctr_3-MA), pois seria de esperar uma percentagem de morte igual ou superior às dos controlos. Tal facto não se verificou e uma possível explicação pode dever-se ao pré-condicionamento por CO a que os astrócitos foram sujeitos, pois o CO pode ter induzido outras vias de protecção celular que não a autofagia, razão pela qual se verifica uma diminuição da percentagem de morte em relação ao controlo. No entanto, essas vias não foram suficientes para evitar que houvesse menos morte celular, em relação aos astrócitos que estão apenas pré-condicionados com CO. Esta hipótese demonstra que a autofagia é um processo fundamental no mecanismo pelo qual o CO protege os astrócitos. Outra hipótese que se pode colocar é o facto de poder existir uma acção incompleta do agente químico 3-MA, o que significa que a autofagia não foi

suprimida na sua totalidade, levando assim a um “semi-resgate” celular. Os valores utilizados nesta figura podem ser consultados na tabela 8.11, no anexo I.

4.3.2. Estudo do papel da autofagia por inibição genética

Como por inibição química a autofagia participa no mecanismo citoprotector do CO, procedeu-se à sua validação por inibição genética, onde foram utilizadas culturas primárias de astrócitos em que o gene Atg5 não é expresso (ATG5^{-/-}). A inibição deste gene impede que haja formação de autofagossomas, por ser uma proteína fundamental para a formação destas estruturas.



Esquema 4.2. Hipótese do mecanismo de protecção proposto – inibição genética. Através de inibição genética (ATG5^{-/-}), do pré-condicionamento de astrócitos com CO e da adição de *stress* oxidativo (*t*-BHP), de acordo com a ordem temporal de adição estabelecida, pretende-se observar um decréscimo na viabilidade celular.

De acordo com o mecanismo proposto no esquema 4.2, obteve-se a figura a figura 4.17.

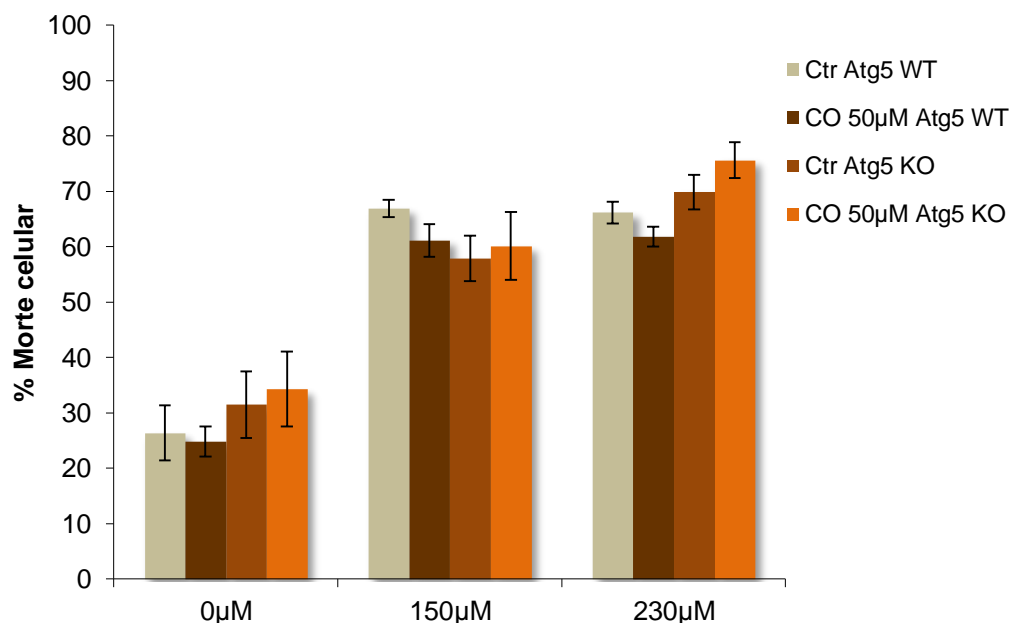


Figura 4.17. Autofagia: um mecanismo importante no papel citoprotector do monóxido de carbono em astrócitos – determinação por inibição genética. A figura representa a percentagem de morte celular após células pré-condicionadas com CO a 50µM terem sido expostas a diferentes concentrações de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP). Astrócitos ATG5^{-/-} foram utilizados para avaliar o papel da autofagia por inibição genética. As concentrações de *t*-BHP foram escolhidas após observação da incidência de morte. Abreviaturas: Ctr Atg5 WT: controlo de células Atg5^{+/+}; CO 50µM Atg 5 WT: células Atg5^{+/+} expostas a 50µM de monóxido de carbono; Ctr Atg5 KO: controlo de células ATG5^{-/-}; CO 50µM Atg5 KO: células ATG5^{-/-} expostas a 50µM de monóxido de carbono.

É possível verificar que para as duas concentrações de *t*-BHP testadas, o CO desempenha funções de citoproteção – percentagem de morte de astrócitos pré-condicionados com CO (CO 50µM Atg5 WT) é inferior à percentagem de morte de astrócitos controlo (Ctr Atg5 WT). Para a concentração mais elevada do agente indutor de morte celular (230µM) os astrócitos com a autofagia inibida (CO 50µM Atg5 KO) apresentam uma percentagem de morte superior ao respectivo controlo (Ctr Atg5 KO), bem como aos astrócitos *wild type* (CO 50µM Atg5 WT). Estes dados (preliminares) confirmam os resultados obtidos com inibição química: autofagia participa no mecanismo de protecção do CO.

Embora exista protecção pelo CO, para as duas concentrações de *t*-BHP testadas, esta é visivelmente menor do que no caso anterior (figura 4.16). O que seria suposto observar-se na figura anterior, ou seja, astrócitos que têm a autofagia inibida apresentarem uma percentagem de morte superior ao seu controlo, apenas é visível nesta figura. Assim, perante estes resultados pode-se colocar a hipótese de que, na figura anterior, o 3-MA não esteja a inibir por completo a autofagia e por isso, seja visível uma diminuição da percentagem de morte (CO_3-MA), quando comparado com os respectivos controlos (Ctr_3-MA).

Uma possível justificação para o aumento geral da percentagem de morte celular ou até mesmo para o facto de a protecção ser tão baixa, pode dever-se a estar a trabalhar com culturas que apresentem um grau de pureza de astrócitos relativamente baixo (cerca de 60%), o que dificulta a

obtenção de resultados válidos. Provavelmente, os outros tipos celulares não apresentam as resistências que os astrócitos têm para as doses de *t*-BHP testadas nem provavelmente a dose de CO (50µM) será a correcta, o que aumenta a percentagem de morte celular. Como tal, é necessário otimizar a extracção e cultura de astrócitos com 18.5 dias de gestação, para que se possa efectivamente validar os resultados obtidos na presença do inibidor químico. Os valores utilizados nesta figura podem ser consultados na tabela 8.12, no anexo I.

Estes dados, apesar de preliminares, revelaram algumas informações importantes sobre a autofagia em astrócitos, indicando ser um processo fundamental para que o monóxido de carbono possa induzir vias de sinalização que levam à protecção celular. Estes resultados estão em concordância com outras evidências experimentais de outros autores, que apresentam autofagia como mecanismo protector e não de um mecanismo de morte celular (tipo II) como inicialmente descrito [33, 39].

CONCLUSÃO

5. Conclusão

Um episódio de HIR cerebral pode causar danos irreparáveis ao limitar o acesso de oxigénio e nutrientes às células, levando à morte celular. Vários estudos sugerem a autofagia como um processo citoprotector contra a HIR [33]. Por outro lado, as propriedades do CO enquanto agente citoprotector, têm sido descritas na Literatura e actualmente a sua capacidade de activar vias de sinalização anti-apoptóticas e anti-inflamatórias em resposta à HIR é um assunto de intensa investigação [54, 75]. Assim sendo, esta tese de mestrado teve como objectivo final, estudar o papel da autofagia no efeito anti-apoptótico do CO conferido aos astrócitos.

Foram propostos dois objectivos específicos para este estudo: **(i)** determinar se o CO induz a autofagia, onde o seu efeito foi estudado em dois tipos celulares diferentes, em HeLa GFP-LC3 e em astrócitos; e **(ii)** explorar se a autofagia desempenha algum papel no mecanismo citoprotector do CO, que apenas foi estudado em astrócitos.

O objectivo principal de trabalhar com uma linha celular foi o de verificar se o trabalho desenvolvido em astrócitos pode ser reproduzido em qual outro tipo celular – *proof of concept*. A linha celular HeLa GFP-LC3 foi escolhida devido ao facto de estar transfectada com a proteína GFP-LC3, o que facilita a utilização de técnicas, tais como citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Trabalhar com uma linha celular também tem as suas vantagens, uma vez não ser necessário isolar nem deixar a maturar durante semanas como acontece com culturas primárias.

De acordo com os resultados obtidos com a linha celular HeLa GFP-LC3, pode-se concluir que, neste modelo o CO induz autofagia a uma concentração óptima de 50µM. Também foi possível determinar que a autofagia induzida pelo CO é um processo rápido. O máximo de proteína LC3II semi-quantificada por *western blot* foi a 3h após o tratamento com CO, que está de acordo com o máximo de autofagossomas analisado por microscopia de fluorescência, também a 3h. Enquanto que, o *quenching* máximo resultante da formação de autolisossomas ocorreu 6h após as células terem sido expostas ao CO, observado através da diminuição da fluorescência da proteína GFP-LC3 por citometria de fluxo. Assim, com base nestes resultados preliminares pode-se propor uma linha temporal de acontecimentos, que começam a 1h após as células terem sido expostas a CO, com o aumento dos níveis de proteína GFP-LC3 no citoplasma (CF). Ao fim de 3h, há um aumento da formação de autofagossomas, pois foi possível ver este aumento por monitorização dos níveis da proteína LC3II (WB) e por acumulação de autofagossomas (MF), finalmente a 6h, através do *quenching*, pode-se concluir que provavelmente houve degradação dos autofagossomas (CF).

Esta linha temporal proposta necessita de ser validada, pelo que é necessário repetir todas as experiências de modo a aumentar o número de eventos estatísticos.

Conclusão

A linha celular HeLa GFP-LC3 revelou-se de enorme utilidade como instrumento de estudo do CO na modulação da autofagia. De forma mais simples, foi possível verificar não apenas a capacidade do CO em activar autofagia, como também caracterizar a sua cinética de acção.

Os astrócitos são células com um papel fundamental na manutenção da homeostase do cérebro, apresentam funções de neuroprotecção e fornecimento energético para os neurónios. Assim sendo, o presente trabalho teve como estratégia estudar a inibição da morte celular nestas células da glia. Já foi demonstrado anteriormente que o CO protege os astrócitos contra a apoptose induzida por *stress* oxidativo [21, 58]. Contudo, todas as vias de sinalização pelo qual o CO actua permanecem por elucidar. Desta forma, os astrócitos foram expostos a 50µM de CO durante 3h e 6h, com o intuito de verificar se existe uma relação entre o papel da autofagia e o mecanismo utilizado pelo CO, para proteger as células de *stress* oxidativo. De acordo com os resultados obtidos por *western blot*, demonstrou-se que 3h após as células serem expostas a CO, a autofagia é activada acima do nível basal, pois os níveis intracelulares de LC3II encontram-se mais elevados que o respectivo controlo na presença de HCQ. Embora após 3h de exposição a CO seja visível um aumento da autofagia na célula, após 6h a diferença nos níveis de LC3II entre astrócitos tratados com CO e sem CO (controlo), é maior do que a diferença encontrada a 3h. Assim, aparentemente o CO em astrócitos apresenta uma cinética mais lenta de activação da autofagia do que nas células HeLa.

Com o objectivo de se estudar a importância da autofagia, no mecanismo pelo qual o CO protege contra a morte celular, foi testada a viabilidade dos astrócitos por citometria de fluxo quando o processo autofágico encontrava-se inibido. Este teste funcional é muito importante na medida em que, o CO funciona por pré-condicionamento, o que faz com que os seus efeitos possam ser muito baixos, e assim a indução da autofagia poder ser de difícil detecção. A autofagia foi inibida por adição de um inibidor químico e pela utilização de astrócitos ATG5^{-/-}, ou seja, através de inibição genética. Assim, primeiramente sob a acção do inibidor autofágico químico (3-MA), foi possível confirmar que a citoprotecção do CO contra *stress* oxidativo depende da activação da autofagia, uma vez que a sua inibição retira o efeito anti-apoptótico do CO.

Por outro lado, quando os astrócitos utilizados não continham o gene Atg5, o resultado obtido foi um pouco diferente do esperado, porque a inibição de autofagia retirou muito parcialmente o efeito protector do CO. É importante chamar a atenção de que nesta estratégia, o CO apresentou níveis de citoprotecção mais baixos. Estas diferenças julgam-se ser devidas a problemas de isolamento de astrócitos (para se obter culturas primárias de astrócitos ATG5^{-/-}, o protocolo teve de ser adaptado), e existe alguma probabilidade das culturas estarem contaminadas com outros tipos celulares.

De um modo geral, devido ao período limitado para trabalhar com culturas primárias de astrócitos (máximo de 2 semanas após maturação), além de terem sido necessários meses para se conseguir minimizar a contaminação por outros tipos celulares após o isolamento e cultura de astrócitos ATG5^{-/-}, o número de experiências é reduzido, razão pela qual, estes resultados são apenas considerados de

preliminares. De modo a validar por completo estes resultados, será necessário aumentar o número de experiências, bem como otimizar o processo de isolamento e cultura. No entanto, estes resultados preliminares indicam que a autofagia é importante para o mecanismo protector do CO em astrócitos. Em conclusão, o CO é anti-apoptótico em astrócitos por **(i)** limitar a permeabilização das membranas mitocondriais e a consequente activação de factores pró-apoptóticos [21] **(ii)** melhorar o metabolismo mitocondrial [58] e **(iii)** activar a autofagia (dados tese de mestrado).

Apesar de toda a controvérsia existente na comunidade científica sobre qual o verdadeiro papel da autofagia, pois inicialmente foi considerado um processo de morte celular, esta tese de mestrado permitiu concluir que, neste modelo experimental, a autofagia actua como um mecanismo protector para as células.

Ao comparar-se os resultados da linha HeLa GFP-LC3 com os dos astrócitos, bem como o tempo despendido e número de experiências realizadas para cada um dos tipos celulares, é possível concluir que o CO induz melhor a autofagia em astrócitos do que nas células HeLa GFP-LC3. Isto pode dever-se ao facto dos astrócitos serem células que estão metabolicamente programadas para estarem constantemente a activar os seus mecanismos de defesa, uma vez que têm como uma das suas principais funções proteger os neurónios de qualquer insulto. Para além da neuroprotecção, os astrócitos são também a principal fonte de carbono/energia dos neurónios, representando uma importante reserva energética. Uma vez que a autofagia é activada também para manter os níveis energéticos celulares, pode-se colocar a hipótese de que estas células tenham uma pré-disposição genética para activar a autofagia acima do limite normal, mais facilmente do que na linha celular HeLa GFP-LC3. Mantendo sempre presente que se trata de resultados preliminares, pode-se concluir que o modo de acção do CO por autofagia seja dependente do tipo celular.

PERSPECTIVAS FUTURAS

6. Perspectivas futuras

Existe uma necessidade crescente de desenvolver estratégias que possam proteger astrócitos e neurónios de danos causados por HIR. A protecção conferida a estas células através da modulação da autofagia pelo CO surge como uma nova e inovadora terapia. As propriedades da molécula de monóxido de carbono permitem proteger os astrócitos de *stress* oxidativo que, indiretamente protege os neurónios de um modo mais fisiológico.

Em relação ao trabalho desenvolvido é necessário validar os resultados obtidos, por aumento do número de experiências para a linha celular HeLa GFP-LC3, de modo a obter-se melhores conclusões. Para os astrócitos é necessário otimizar as experiências com astrócitos Atg5 *knockout*, especialmente o método de isolamento de células e manutenção das culturas primárias. Somente após a realização destes pontos o estudo proposto estará completo para publicação.

Para a linha celular HeLa GFP-LC3 propõe-se a longo prazo continuar com o seu estudo, de modo a poder entender no futuro, quais as vias que controlam a autofagia em HeLa GFP-LC3 por comparação aos astrócitos, de forma a perceber as diferenças.

Relativamente aos astrócitos, uma das experiências que se propõe será de se tentar outras técnicas para se validar os resultados com a proteína LC3 (WB), uma importante abordagem seria a utilização de murganhos transgénicos para a proteína GFP-LC3. Desta forma, tal como realizado para a linha celular HeLa GFP-LC3, pretende-se quantificar o número de autofagossomas e seguir a sua degradação por fluorescência (CF e MF). Em adicção, a expressão de genes autofágicos (tais como Atg 5, Atg 7, Atg 12 e Bec-1) podem ser seguidos por reacção de polimerização em cadeia pela transcriptase reversa (RT-Q-PCR), para quantificação de mRNA.

Outra abordagem interessante poderá ser, com base nestes resultados, testar o efeito do CO em astrócitos a 6h ao invés de 3h, visto que, os níveis de LC3II eram maiores após 6h quando comparados com os obtidos a 3h. Assim, especula-se que o CO será mais eficiente na protecção contra *stress* oxidativo se o CO for adicionado 6h antes da indução de morte celular.

O CO é de facto uma molécula quimicamente muito estável e endógena, mas apresenta uma enorme desvantagem ao ter uma elevada afinidade para a hemoglobina que origina a carboxihemoglobina que em concentrações elevadas é tóxico, limitando as suas aplicações terapêuticas *in vivo* [76]. As CORM's (*CO-releasing molecules*) são moléculas terapêuticas que libertam quantidades controladas de CO em tecidos e órgãos, tendo um efeito semelhante ao CO, e acima de tudo são compatíveis com o ambiente fisiológico [52, 76]. Estes compostos farmacológicos tornam-se uma escolha atractiva para fins medicinais, bem como para minimizar as consequências de um insulto de HIR. Deste modo, propõe-se que quando se valide *in vivo* os resultados obtidos *in vitro*, para além de se testar CO como gás, testar também as CORM's.

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

1. Nolte, J., *The human brain: an introduction to its functional anatomy*. 6th edition ed. 2009: mosby Elsevier.
2. Quaegebeur, A., C. Lange, and P. Carmeliet, *The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Neuron, 2011. **71**(3): p. 406-24.
3. Morest, D.K. and J. Silver, *Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going?* Glia, 2003. **43**(1): p. 6-18.
4. Patrick R. Hof, B.D.T., Jean de Vellis, Luz Claudio, David Colman, *from molecules to networks: An introduction to cellular and molecular neuroscience*. 2004: Elsevier academic press.
5. Zhang, S.C., *Defining glial cells during CNS development*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 840-3.
6. Liu, W., Y. Tang, and J. Feng, *Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system*. Life Sci, 2011. **89**(5-6): p. 141-6.
7. Theodosis, D.T., D.A. Poulain, and S.H. Oliet, *Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions*. Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 983-1008.
8. Trendelenburg, G. and U. Dirnagl, *Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning*. Glia, 2005. **50**(4): p. 307-20.
9. Allaman, I., M. Belanger, and P.J. Magistretti, *Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse*. Trends Neurosci, 2010. **34**(2): p. 76-87.
10. Barreto, G., et al., *Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2011. **11**(2): p. 164-73.
11. Watkins, L.R. and S.F. Maier, *Glia: a novel drug discovery target for clinical pain*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(12): p. 973-85.
12. Volpe, J.J., *Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection*. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2001. **7**(1): p. 56-64.
13. Green, A.R., *Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly*. Br J Pharmacol, 2008. **153** Suppl 1: p. S325-38.
14. Krieger, D.W. and M.A. Yenari, *Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us?* Stroke, 2004. **35**(6): p. 1482-9.
15. Vannucci, S.J. and H. Hagberg, *Hypoxia-ischemia in the immature brain*. J Exp Biol, 2004. **207**(Pt 18): p. 3149-54.
16. Chamoun, F., et al., *Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury*. Front Biosci, 2000. **5**: p. E103-9.
17. Rami, A. and D. Kogel, *Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin?* Autophagy, 2008. **4**(4): p. 422-6.
18. Tucker, N.R., et al., *HSF1 is essential for the resistance of zebrafish eye and brain tissues to hypoxia/reperfusion injury*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22268.
19. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
20. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 725-31.
21. Queiroga, C.S., et al., *Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. J Biol Chem, 2010. **285**(22): p. 17077-88.
22. Kroemer, G. and B. Levine, *Autophagic cell death: the story of a misnomer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(12): p. 1004-10.
23. Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar, *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(9): p. 422-7.
24. Au, A.K., et al., *Evaluation of autophagy using mouse models of brain injury*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1802**(10): p. 918-23.
25. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
26. Huang, C., et al., *Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20975.
27. Huang, J., G.Y. Lam, and J.H. Brumell, *Autophagy signaling through reactive oxygen species*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(11): p. 2215-31.

28. Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 280-93.
29. Huang, C., et al., *Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(4): p. 365-73.
30. Mehrpour, M., et al., *Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells*. Cell Res, 2010. **20**(7): p. 748-62.
31. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-34.
32. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
33. Liu, C., et al., *Autophagy and protein aggregation after brain ischemia*. J Neurochem, 2010. **115**(1): p. 68-78.
34. Liu, Z. and M.J. Lenardo, *Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 484-5.
35. Boya, P., et al., *Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1025-40.
36. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
37. Chang, N.C., et al., *Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1*. Embo J, 2010. **29**(3): p. 606-18.
38. Moscat, J. and M.T. Diaz-Meco, *p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1001-4.
39. Carloni, S., G. Buonocore, and W. Balduini, *Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury*. Neurobiol Dis, 2008. **32**(3): p. 329-39.
40. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
41. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1287-95.
42. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. Embo J, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
43. Dirnagl, U., K. Becker, and A. Meisel, *Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use*. Lancet Neurol, 2009. **8**(4): p. 398-412.
44. Kirino, T., *Ischemic tolerance*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(11): p. 1283-96.
45. Dirnagl, U., R.P. Simon, and J.M. Hallenbeck, *Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection*. Trends Neurosci, 2003. **26**(5): p. 248-54.
46. Alkan, T., *Neuroprotective effects of ischemic tolerance (preconditioning) and postconditioning*. Turk Neurosurg, 2009. **19**(4): p. 406-12.
47. Liu, X.Q., R. Sheng, and Z.H. Qin, *The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning*. Acta Pharmacol Sin, 2009. **30**(8): p. 1071-80.
48. Sheng, R., et al., *Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning*. Autophagy, 2010. **6**(4).
49. Motterlini, R. and L.E. Otterbein, *The therapeutic potential of carbon monoxide*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 728-43.
50. Bilban, M., et al., *Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(3): p. 267-79.
51. Zeynalov, E. and S. Dore, *Low doses of carbon monoxide protect against experimental focal brain ischemia*. Neurotox Res, 2009. **15**(2): p. 133-7.
52. Zimmermann, A., et al., *Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule CORM-A1 against seizure-induced neonatal vascular injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2501-7.
53. Vieira, H.L., C.S. Queiroga, and P.M. Alves, *Pre-conditioning induced by carbon monoxide provides neuronal protection against apoptosis*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 375-84.
54. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **41**(3): p. 251-60.
55. Lee, S.J., et al., *Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(4): p. 867-73.
56. Wang, B., et al., *Carbon monoxide-activated Nrf2 pathway leads to protection against permanent focal cerebral ischemia*. Stroke. J. American Heart Association, 2011. **42**(9): p. 2605-10.
57. Queiroga, C.S., et al., *Preconditioning Triggered by Carbon Monoxide (CO) Provides Neuronal Protection Following Perinatal Hypoxia-Ischemia*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42632.

58. Almeida, S.S., et al., *Carbon monoxide modulates apoptosis by reinforcing oxidative metabolism in astrocytes: role of BCL-2*. J Biol Chem, 2012.
59. Schousboe, I.D.A., *Manual for preparation of primary cultures of astrocytes and neurons*. 2001, Copenhagen: Royal Danish School of Pharmacy.
60. Guillemín, G., et al., *Obtention and characterization of primary astrocyte and microglial cultures from adult monkey brains*. J Neurosci Res, 1997. **49**(5): p. 576-91.
61. Motterlini, R., et al., *Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities*. Circ Res, 2002. **90**(2): p. E17-24.
62. Reiter, T.A. and B. Dimple, *Carbon monoxide mediates protection against nitric oxide toxicity in HeLa cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(8): p. 1075-88.
63. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Autophagy in the cellular energetic balance*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 495-504.
64. Bampton, E.T., et al., *The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 23-36.
65. Vazquez, P., et al., *Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells*. Autophagy, 2012. **8**(2): p. 187-99.
66. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
67. Mellen, M.A., E.J. de la Rosa, and P. Boya, *The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium*. Cell Death Differ, 2008. **15**(8): p. 1279-90.
68. Shvets, E., E. Fass, and Z. Elazar, *Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells*. Autophagy, 2008. **4**(5): p. 621-8.
69. Struhl, F.M.A.R.B.R.E.K.D.D.M.J.G.S.J.A.S.K., *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 6. October 2009 John Wiley&Sans, Inc. 5,300.
70. Viiri, J., et al., *p62/sequestosome 1 as a regulator of proteasome inhibitor-induced autophagy in human retinal pigment epithelial cells*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 1399-414.
71. Alirezai, M., et al., *Short-term fasting induces profound neuronal autophagy*. Autophagy, 2010. **6**(6): p. 702-10.
72. Yu, L., et al., *Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 942-6.
73. Bray, K., et al., *Autophagy Suppresses RIP Kinase-Dependent Necrosis Enabling Survival to mTOR Inhibition*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41831.
74. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-5.
75. Ryter, S.W. and L.E. Otterbein, *Carbon monoxide in biology and medicine*. Bioessays, 2004. **26**(3): p. 270-80.
76. Alberto, R. and R. Motterlini, *Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes*. Dalton Trans, 2007(17): p. 1651-60.

ANEXOS

8. Anexos

8.1. Anexo I

Tabelas com os resultados de citometria de fluxo da linha celular HeLa GFP-LC3.

Tabela 8.1. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para o indutor químico rapamicina, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do total de células. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; rapamicina_HCQ: rapamicina com hidroxicloroquina

Tratamento	1h	3h	24h
Ctr	10.08	7.70	5.84
Rapamicina	8.10	11.90	3.70
Ctr_HCQ	8.24	10.03	6.30
Rapamicina_HCQ	10.40	11.90	4.30

Tabela 8.2. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para o indutor químico rapamicina, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do controlo. Abreviaturas: Ctr: controlo; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; rapamicina_HCQ: rapamicina com hidroxicloroquina

Tratamento	1h	3h	24h
Ctr	100	100	100
Rapamicina	116.11	141.45	97.32
Ctr_HCQ	189.12	182.12	177.56
Rapamicina_HCQ	206.59	202.59	157.89

Tabela 8.3. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para a condição meio EBSS, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do células. Abreviaturas: Ctr: controlo; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina;;Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxicloroquina.

Tratamento	1h	3h	24h
Ctr	10.08	7.70	13.84
Meio EBSS	3.40	5.20	26.10
Ctr_HCQ	8.24	10.03	6.30
Meio EBSS_HCQ	10.40	4.80	37.30

Tabela 8.4. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para a condição meio EBSS, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do controlo. Abreviaturas Ctr: controlo; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxicloroquina.

Tratamento	1h	3h
Ctr	100	100
Meio EBSS	65.90	52.82
Ctr_HCQ	189.12	183.84
Meio EBSS_HCQ	108.79	124.48

Tabela 8.5. Valores de percentagem de morte celular da linha celular HeLa GFP-LC3 para o monóxido de carbono, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do total de células. Abreviaturas: CO: monóxido de carbono; SEM: *standard error of the mean*; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina.

Tratamento	6h		24h		48h	
	CO (µM)	%	SEM	%	SEM	%
0	9.80	5.79	4.95	0.92	4.70	0.99
50	11.35	1.20	5.20	0.42	5.40	1.20
100	12.40	1.84	4.70	1.41	5.75	0
200	16.10	1.13	5.70	0.99	12.45	0.64

Tabela 8.6. Valores de percentagem de intensidade de fluorescência da proteína GFP-LC3 para o monóxido de carbono, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do controlo. Abreviaturas: SEM: *standard error of the mean*; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; CO 50µM_HCQ: monóxido de carbono a 50µM com hidroxicloroquina.

Tratamento	1h		3h		6h	
	%	SEM	%	SEM	%	SEM
Ctr	100	3.19	100	1.52	100	3.25
CO 50µM	109.21	1.39	101.15	1.36	96.95	3.53
Ctr_HCQ	182.98	3.97	167.37	2.97	168.25	3.99
CO 50µM_HCQ	180.33	3.75	170.19	2.96	190	7.61

Tabela 8.7. Valores de intensidade de fluorescência das bandas obtidas nos filmes de *western blot* para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono. Os valores apresentados estão expressos em função do controlo. Abreviaturas: UA: unidade arbitrária; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; CO 100µM: monóxido de carbono a 100µM; CO 200µM: monóxido de carbono a 200µM; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina; p-S6: proteína ribossomal p-S6; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

		Tratamento	p62 (UA)	p-S6 (UA)	LC3II (UA)	LC3II/LC3I (UA)
3h	- HCQ	Ctr	1	1	1	1
		CO 50µM	0.95	0.70	0.97	0.88
		CO 100µM	0.56	1	1.12	2.27
	+ HCQ	Ctr	0.82	1.35	1.10	1.03
		CO 50µM	0.61	1.34	1.28	1.92
		CO 100µM	0.46	1.02	1.33	1.19
24h	- HCQ	Ctr	1	1	1	1
		CO 50µM	0.88	1.58	0.96	1.32
		CO 100µM	0.51	1.27	0.87	0.73
	+ HCQ	Ctr	0.52	1.88	1.09	1.22
		CO 50µM	0.20	1.69	1.06	1.54
		CO 100µM	0.25	1.84	0.90	1.23

Tabela 8.8 Valores do número médio de autofagossomas por célula medidos através da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3, por microscopia de fluorescência para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença da condição meio EBSS. Abreviaturas Ctr: controlo; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; Meio EBSS_HCQ: meio *Earle's Balanced Salt Solution* com hidroxicloroquina.

Tratamento	1h	3h	6h
Ctr	19.90	17.27	22
Meio EBSS	13.61	9.23	11.13
ctr_HCQ	23.08	30.59	27.78
Meio EBSS_HCQ	20.54	25.67	17.51

Tabela 8.9. Valores do número médio de autofagossomas por célula medidos através da fluorescência emitida pela proteína GFP-LC3, por microscopia de fluorescência para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono. Abreviaturas: SEM: *standard error of the mean*; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; Ctr_HCQ: controlo com hidroxicloroquina; CO 50µM_HCQ: monóxido de carbono a 50µM com hidroxicloroquina.

Tratamento	Nº médio de autofagossomas/célula	SEM
Ctr	16.24	1.97
CO 50µM	24.75	3.39
Ctr_HCQ	23.92	2.23
CO 50µM_HCQ	33.50	2.22

Tabela 8.10. Valores de intensidade de fluorescência das bandas obtidas nos filmes de *western blot* para a linha celular HeLa GFP-LC3, na presença de monóxido de carbono. Os valores apresentados estão expressos em função do controlo. Abreviaturas: UA: unidade arbitrária; Ctr: controlo; CO 50µM: monóxido de carbono a 50µM; Meio EBSS: meio *Earle's Balanced Salt Solution*; - HCQ: sem hidroxicloroquina; + HCQ: com hidroxicloroquina.

		Tratamento	LC3II (UA)	LC3II/LC3I (UA)
3h	- HCQ	Ctr	1	1
		CO 50µM	1,30	2,32
	+HCQ	Ctr	1,74	3,98
		CO 50µM	1,92	4,26
6h	- HCQ	Ctr	1	1
		CO 50µM	0,32	1,10
	+HCQ	Ctr	1,04	1,77
		CO 50µM	1,40	2,36
3h	-HCQ	Meio EBSS	1,86	0,37
	+HCQ	Meio EBSS	6,95	0,87
6h	- HCQ	Meio EBSS	0,21	0,12
	+HCQ	Meio EBSS	0,09	0,05

Tabela 8.11. Valores de percentagem de morte celular em astrócitos na presença de 3-metiladenina e *tert*-butil hidroperóxido, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do total de células. 150µM, 230µM e 320µM foram as concentrações de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) testadas. Abreviaturas: SEM: *standard error of the mean*; Ctr: Controlo; Ctr_3-MA: controlo com 3-metiladenina; CO: monóxido de carbono; CO_3-MA: monóxido de carbono com 3-metiladenina.

Tratamento	% de morte celular	SEM
Ctr	7,57	0,24
Ctr 150µM	50,60	0,42
Ctr 230µM	59,05	3,04
Ctr 320µM	61,35	0,35
Ctr_3-MA	7,96	1,59
Ctr 150µM_3-MA	57,20	0,99
Ctr 230µM_3-MA	59,63	2,77
Ctr 320µM_3-MA	61,60	0
CO	7,09	3,17
CO 150µM	42,85	0,35
CO 230µM	35,30	0,57
CO 320µM	42,87	0,90
CO_3-MA	6,23	1,32
CO 150µM_3-MA	52,25	1,06
CO 230µM_3-MA	41,45	5,02
CO 320µM_3-MA	52,85	0,35

Tabela 8.12. Valores de percentagem de morte celular em astrócitos Atg 5 *knockout* na presença de *tert*-butil hidroperóxido, obtidos após tratamento de dados. Os valores apresentados estão expressos em percentagem do total de células. 150µM e 230µM foram as concentrações de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) testadas. Abreviaturas: SEM: *standard error of the mean*; Ctr: CO: monóxido de carbono; WT: *wild type*; KO: *knockout* do gene Atg 5.

Tratamento	% de morte celular	SEM
Ctr_WT	26,40	2,02
Ctr 150µM_WT	66,90	1,57
Ctr 230µM_WT	66,17	4,97
CO_WT	32,15	1,82
CO 150µM_WT	61,14	2,90
CO 230µM_WT	61,85	2,70
Ctr_KO	31,50	6,76
Ctr 150µM_KO	57,90	6,11
Ctr 230µM_KO	69,88	3,29
CO_KO	34,90	13,82
CO 150µM_KO	60,11	4,14
CO 230µM_KO	75,64	3,09